

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Specializace: Genetika volně žijících živočichů



Bc. Karolína Bílková

Vliv suplementace karotenoidy a oxidačního stresu na morfologii, kvalitu spermií a spermatogenezi u zebříčky pestré

Interactive effects of carotenoid supplementation and oxidative stress on sperm morphology, sperm quality and spermatogenesis in the Zebra finches

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 30. 4. 2018

Karolína Bílková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. a konzultantce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky v průběhu zpracování diplomové práce. Děkuji celému týmu Laboratoře reprodukční biologie za přátelskou atmosféru a morální podporu během celého studia. Obrovský dík patří zejména Míše, která mě zasvětila do tajů imunofluorescence a poskytovala cenné rady při psaní a Hasmik, která mě naučila nebát se mikrotomu. Dále bych chtěla poděkovat Oldovi, Pavlíně a Janě ze Studence, kteří mi věnovali čas a poradili, kdykoliv jsem potřebovala. Práce by ale nikdy nevznikla bez Jardy a Veroniky. Děkuji, že jsem Vás potkala, že Vás mám a nenechali jste mě to vzdát.

Abstrakt

Hypotéza „phenotype-linked fertility“ předpokládá, že jak sekundární pohlavní znaky samců, tak jejich spermie jsou fenotypově plastické a mohou být ovlivňovány prostředím. Jedním z faktorů ovlivňujících jejich fenotyp může být oxidační stres a schopnost organismu jeho vliv eliminovat. Oxidační stres může snižovat kvalitu spermií, neboť spermie postrádají schopnost oprav DNA, může však ovlivnit i samotný proces spermatogeneze. Některé látky však mohou působit jako antioxidanty, a tím eliminovat působení reaktivních molekul kyslíku (oxidační stres) v organismu. V této studii byli samci zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) z domestikované populace blízké divokým zebřičkám dlouhodobě vystaveni působení herbicidu diquat (D), který zvyšuje oxidační stres a karotenoidu luteinu (L), který by mohl mít antioxidační funkci. Design pokusu měl faktoriální charakter 2x2 s kontrolou (skupiny L, D, LD, kontrola). Oxidační stres, karotenoidy ani jejich interakce neměla vliv na morfologii spermií, na jejich rychlost či na zvýšení podílu abnormálních spermií v ejakulátu. Rozdíly však byly pozorovány na molekulární úrovni, kdy spermie působením oxidačního stresu měly sníženou intenzitu signálu acetylovaného α -tubulinu v bičíku. Snížená míra acetylace by mohla být znakem strukturního poškození bičíku. Při současném podávání diquat i luteinu se však poměr mezi spermiemi se slabým a silnějším signálem vyrovnal. Změny odhalila také morfometrická analýza varlat, kdy působením oxidačního stresu došlo ke zmenšení průměru semenotvorných kanálků a zároveň k nárůstu výšky semenotvorného epitelu. Zmenšení průměru semenotvorných kanálků bylo pozorováno také u skupiny ovlivněné diquatem a zároveň luteinem. K nárůstu výšky semenotvorného epitelu u této skupiny však nedošlo, kdy lze usuzovat, že lutein pozitivně zamezil projevu tohoto patologického stavu. Práce potvrzuje negativní vliv oxidačního stresu na spermie a průběh spermatogeneze u zebřičky pestré. Zároveň demonstrovuje důležitost karotenoidů pro zachování redoxní rovnováhy a jejich částečně antioxidační efekt za podmínek oxidačního stresu.

Klíčová slova: spermie, spermatogeneze, oxidační stres, karotenoidy, acetylace α -tubulinu, zebřička pestrá

Abstract

The phenotype-linked fertility hypothesis predicts that both, male carotenoid-based sexual ornamentation and their spermatozoa are phenotypically plastic and may be co-affected by the environment. One of the factors affecting their phenotype may be oxidative stress and the ability of organism to eliminate its effect. Oxidative stress may reduce sperm quality because sperm lack the ability to repair DNA, but it can also affect spermatogenesis itself. However, some substances may function as antioxidants, and thus eliminate effect of reactive oxygen species (oxidative stress) in the body. In this study, adult zebra finch males (*Taeniopygia guttata*) originating from the domesticated and recently wild-derived populations were exposed to the diquat (D), which enhances the oxidative stress, and carotenoid lutein (L), which could have an antioxidant function. Experimental design had factorial character 2x2 with a control (group L, D, LD, control). Neither oxidative stress, carotenoids, nor their interactions affected sperm morphology or velocity and it also did not increase abnormal sperm proportion in the ejaculate. However, the differences were observed at the molecular level, where by inducing the oxidative stress, the sperm had reduced signal intensity of acetylated α -tubulin in the sperm tails. Reduced rate of acetylation could be a sign of structural damage of the sperm tails. However, when a combination of diquat and lutein was used, the ratio between sperm with a weaker and stronger signal was equalized. Morphometric analysis of the testes also revealed significant changes. Oxidative stress caused the reduction of the mean diameter of seminiferous tubules and it increased the height of seminiferous epithelium. The reduction of the mean diameter of seminiferous tubules was also observed in the combination of the lutein and diquat-treated group. However, the increase in the height of the seminiferous epithelium did not occur in this group, and lutein was able to prevent this pathological condition. This work thus confirms the negative influence of oxidative stress on sperm and on spermatogenesis in zebra finch males. It also demonstrates the importance of carotenoids for maintaining redox homeostasis and their partial antioxidant effect under oxidative stress conditions.

Key words: sperm, spermatogenesis, oxidative stress, carotenoids, α -tubulin acetylation, zebra finch

Obsah

1.	Úvod	8
1.1.	Spermatogeneze	10
1.1.1	Morfologie ptačí spermie	12
1.2	Kvalita ejakulátu	14
1.2.1	Délka spermie	14
1.2.2	Rychlost pohybu a životnost spermie	16
1.2.3.	Abnormality spermií	17
1.3.	Reprodukční cyklus ptáků a morfologie varlat	18
1.3.1.	Vliv věku na velikost a asymetrii varlat	19
1.4.	Tubulin.....	19
1.4.1.	Acetylce tubulinu.....	20
1.5.	Spermie a oxidační stres	22
1.5.1	ROS-vznik a funkce.....	22
1.5.2	ROS a poškození biomolekul	23
1.5.3.	ROS a poškození spermií.....	24
1.5.4.	ROS a poškození tkáně varlat.....	25
1.5.5.	Diquat dibromid a toxicita	26
1.6.	Charakteristika karotenoidů	27
1.6.1.	Karotenoidy v pohlavním výběru	28
1.6.2.	Hypotézy o funkci karotenoidů v kontextu oxidačního stresu.....	29
1.7.	Modelový druh.....	30
2.	Cíle práce.....	33
3.	Metodika.....	34
3.1.	Modelový druh a chov	34
3.2.	Experimentální design	34
3.3.	Odběr vzorků a měření motility spermií.....	35
3.4.	Morfometrie spermií	36
3.5.	Analýza abnormalit spermií.....	37
3.6.	Analýza acetylce α -tubulinu.....	38
3.7.	Příprava histologických preparátů a morfometrická analýza	39
3.8.	Statistické metody	41
4.	Výsledky.....	42
4.1.	Populace domestikovaných zebřiček (rok 2011)	42
4.1.1.	Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií a varlat	43

4.1.3.	Vliv diquatu a luteinu na intenzitu a rovnoměrnost signálu acetylovaného α -tubulinu	48
4.1.4.	Vliv intenzity signálu acetylovaného α -tubulinu na rychlost pohybu spermií	51
4.2.	Populace blízka divokým zebříčkám (rok 2012)	52
4.2.1.	Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií.....	53
5.	Diskuze.....	54
5.1.	Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií.....	54
5.2.	Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky varlat.....	56
5.3.	Vliv morfometrie varlat na podíl abnormálních spermií v ejakulátu.....	58
5.4.	Vliv diquatu a luteinu na intenzitu a rovnoměrnost signálu acetylovaného α -tubulinu ..	59
5.5.	Vliv intenzity a rovnoměrnosti signálu acetylovaného α -tubulinu na rychlost pohybu spermií	60
6.	Závěr	62
7.	Seznam literatury	64
8.	Přílohy	76

1. Úvod

Jedním z hlavních mechanismů ovlivňujících reprodukci živočichů je pohlavní výběr. Jedná se o evoluční proces, který zvýhodňuje geny zvyšující reprodukční úspěch svých nositelů (Birkhead & Pizzari 2002). Jeho teoretické základy postuloval již před téměř 150 lety Charles Darwin (Darwin 1871). Díky favorizaci určitých genů se v populaci může zvyšovat počet jedinců nesoucích znaky preferované opačným pohlavím. Tito jedinci tak budou mít vyšší reprodukční úspěch v porovnání s jedinci, kteří preferované znaky mít nebudou (Darwin 1871). Pohlavní výběr se uplatňuje jak před kopulací, tak po kopulaci. Předkopulační pohlavní výběr může probíhat jako intrasexuální, při němž mezi sebou soupeří jedinci stejného pohlaví (většinou samci o samice, tzv. male-male choice) nebo jako intersexuální, probíhající mezi oběma pohlavími (Andersson 1994). Při něm si příslušníci jednoho pohlaví vybírají partnera opačného pohlaví, nejčastěji samice vybírají mezi samci (tzv. female choice).

Až do 70. let 20. století bylo na reprodukci nahlíženo jako na kooperaci mezi samci a samicemi. Poté ale bylo navrženo, že pohlavní výběr probíhá také po kopulaci, v období od inseminace až do oplození vajíčka. Tento tzv. postkopulační pohlavní výběr sestává ze dvou složek, skryté volby samice a kompetice spermií (Parker 1970). Při skryté volbě může samice ovlivnit, který ze samců, s nimiž kopulovala, nakonec oplodní její vajíčka. Jev je poměrně málo prozkoumaný, jelikož probíhá přímo v reprodukčním traktu samic a je obtížné jej studovat, případně odlišit od kompetice spermií (Birkhead 1998; Birkhead & Pizzari 2002). Kompetice spermií nastává tehdy, pokud samice během jedné fertlní periody kopuluje s více samci. Jejich spermie potom v reprodukčním traktu vzájemně soupeří o oplození vajíčka samice. Spermii při tomto soupeření mohou přinést výhodu některé jejich fenotypové vlastnosti, jako např. motilita (pohyblivost), rychlost, velikost, životnost či jejich celkové množství v ejakulátu. Všechny tyto vlastnosti spermií vypovídají o kvalitě ejakulátu a ovlivňují tak reprodukční úspěch samce (Andersson 1994). Na vnitrodruhové úrovni dochází k selekci na optimální fenotyp spermií a co nejvyšší konkurenceschopnost ejakulátu. Postkopulační pohlavní výběr na ně působí stabilizující silou, kdy může např. maximalizovat jejich rychlost pohybu či životnost (Calhim *et al.* 2007; Snook 2005). Na mezidruhové úrovni na fenotyp spermií působí spíše usměrňující selekce, mohou u nich proto vznikat různé adaptace a docházet k jejich koevoluci spolu s reprodukčním traktem samic (Gomendio & Roldan 1993; Miller & Pitnick 2002; Anderson *et al.* 2006).

Při intersexuálním předkopulačním výběru partnera je důležitým kritériem jeho atraktivita, která mu může zvýšit reprodukční úspěch před konkurenty (Eberhard 1996). Tato atraktivita je signalizována skrze sekundární pohlavní znaky. Většinou bývají nápadnější u samců, jelikož u nich probíhá intenzivnější pohlavní výběr, vedoucí ke vzniku pohlavního dimorfismu (Owens & Hartley 1998). Takovým znakem může být u ptáků intenzita zbarvení

zobáku, zbarvení peří, velikost různých ornamentů, chocholky, hřebínky či ostruhy (von Schantz *et al.* 1999). Všechny tyto znaky mají pro samice signální a informační funkci o kvalitách jejich nositelů. Expze takových znaků je pro jedince totiž energeticky velmi nákladná a může dokonce snižovat jeho fitness (Zahavi 1975). Indikátorová hypotéza předpokládá, že tyto sekundární pohlavní znaky fungují jako čestné signály, jelikož jsou nákladné nejen na vznik, ale i na jejich udržování. Proto samec, který i přes jejich nákladnost takové znaky má a dožil se reprodukčního věku, má skutečně kvalitní geny (Zahavi 1975). Tyto výhodné geny také mohou zdědit jejich potomci (Fisher 1958).

Předpokládá se také vztah fenotypu mezi těmito sekundárními a primárními pohlavními znaky: spermiemi a varlaty (Andersson & Simmons 2006). Byla proto formulována hypotéza „phenotype-linked fertility“ (PLFH) která předpokládá, že jak ornamenty užívané při výběru partnera před kopulací, tak znaky důležité po kopulaci (kvalita gamet) jsou fenotypově plastické, mohou být ovlivněny stejnými mechanismy a vypovídat tak o kvalitách jedince (Sheldon 1994). Takovými mechanismy mohou být různé genetické a environmentální faktory, nebo jejich vzájemné interakce. Jedním z nejvíce diskutovaných environmentálních faktorů je oxidační stres a schopnost organismu jeho vliv eliminovat. Do popředí zájmu se dostal v 50. letech 20. století a od té doby je spojován se vznikem řady onemocnění, mimo jiné s mužskou neplodností a sníženou motilitou spermií (Harman 1956; De Lamirande & Gagnon 1992; Roberts 1998). Variantou PLFH hypotézy je „redox-based PLFH“ hypotéza, při které se organismus snaží udržet rovnováhu mezi prooxidačními a antioxidačními mechanismy (tzv. redoxní homeostáza). Uvažuje o oxidačním stresu jako o faktoru vychylujícím tuto rovnováhu a ovlivňujícím jak ornamentaci, tak kvalitu spermií (Blount *et al.* 2001). Alternativou k těmto hypotézám je „sperm competition theory“ (SCT), která předpokládá existenci kompromisu (trade-off) mezi investicí do ornamentu představující prekopulační signály kvality a investicí do kvality spermií jako postkopulačních signálů (Tomášek *et al.* 2017). Předpokladem k této hypotéze je pro samce nákladnost produkce ornamentu i omezenost dostupných zdrojů ve formě energie a živin k jejich vzniku (Hill 1996; Hill *et al.* 2002). K té jsou zapotřebí karotenoidy získávané z potravy. Jednou z diskutovaných funkcí karotenoidů je i jejich antioxidační funkce (Pérez-Rodríguez 2009). Samec tak může mít dilema, zda karotenoidy využít k ornamentaci či k možné antioxidační obraně spermií před oxidačním stresem. Výsledky studií o antioxidační funkci karotenoidů se však různí, podle některých žádný vliv na redoxní rovnováhu nemají, podle jiných mohou samy dokonce působit jako prooxidyanty (Palozza 1998). Cílem této práce je zhodnotit možný vliv oxidačního stresu, karotenoidů a interakce mezi nimi na spermie a spermatogenezi u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*). Výsledky by také mohly přispět k objasnění, zda a jakou mají karotenoidy roli při spermatogenezi na redoxní rovnováhu a podpořit některou z výše uvedených hypotéz.

1.1. Spermatogeneze

Spermie u pohlavně dospělých ptáků vznikají ve varlatech, v semenotvorných kanálcích při procesu zvaném spermatogeneze. Varlata ptáků jsou uložena na dorzální straně břišní dutiny, čímž jsou spermie vystaveny vyšším teplotám. Proto dochází k tvorbě spermií hlavně v noci, kdy je celková teplota těla nižší. Spermatogeneze je proces řízený hormonálně hypothalamem, který produkuje gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH), jehož množství stoupá s prodlužující se délkou dne (Dawson *et al.* 2001). Zásadní vliv na zahájení reprodukční aktivity může mít pro ptáky prodloužení délky dne o pouhých 17 minut, jak bylo zdokumentováno u tropického pěvce mravenčíka tečkopsého (*Hylophylax neavioides*) (Hau *et al.* 1998). GnRH stimuluje adenohypofýzu k produkci gonadotropinů: folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH), který nastartuje spermatogenezi produkci testosteronu (T) v Leydigových buňkách (Kuenzel 2000). Produkce a sekrece těchto hormonů je řízena pravděpodobně také inhibičním neuropeptidem, gonadotropin inhibujícím hormonem (GnIH). Přesný mechanismus není dosud znám, pravděpodobně ale působí na více úrovních: v hypothalamu, adenohypofýze a gonádách (Jamieson 2007). Důležitým hormonem řídící reprodukční cyklus je také melatonin, u ptáků produkovaný primárně epifýzou a rohovkou. Ten je pravděpodobně klíčovým faktorem pro indukci GnIH (Ubuka *et al.* 2005).

Tkáň varlat je tvořena intersticiální tkání a semenotvornými kanálky. Intersticiální tkáň se skládá z Leydigových buněk (zvaných též intersticiální), které jsou hlavním zdrojem hormonu testosteronu, který ovlivňuje zrání spermií. Zárodečné a Sertoliho buňky, sloužící k jejich ochraně, výživě a regulaci vývoje tvoří tkáň semenotvorných kanálků. Sertoliho buňky jsou podlouhlé, poměrně velké a jednou stranou přisedají k bazální lamině. Mají také endokrinní funkci, jelikož produkují hormon inhibin, který pravděpodobně ovlivňuje růst a diferenciaci gamet (Sedqyar *et al.* 2008). Zárodečné buňky se během zrání tvarově a velikostně mění a přesouvají se od bazální laminy směrem do lumen semenotvorného kanálku. Zůstávají ale v těsném kontaktu díky mezibuněčným cytoplasmatickým spojmům, které usnadňují synchronizaci jejich vývoje (Parreira *et al.* 2002).

Primární zárodečné buňky jsou spermatogonie ležící po obvodu semenotvorného kanálku, přichyceny k bazální lamině. Zatímco u savců, konkrétně u potkana obecného (*Rattus norvegicus*) se povedlo rozlišit několik generací spermatogonií typu A (A0, A1, A2, A3, A4), intermediární typ a typ B, u ptáků je takto podrobné rozdělení problematické a studie se u různých druhů liší (Clermont & Bustos-Obregon 1968). U kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) a pižmovky velké (*Cairina moschata*) byl nalezen pouze jeden typ spermatogonií, dva typy u perličky kropenaté (*Numida meleagris*) a všechny tři typy u křepelky japonské (*Coturnix japonica*). Studie u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) se různí, spermatogonie se povedlo rozlišit do jednoho i dvou typů (Jamieson 2007). Spermatogonie jsou

diploidní buňky, které se mitoticky dělí a dávají vznik diploidním spermatocytům I. typu, které se vyznačují velkým jádrem s chromatinem přidruženým k jaderné membráně. Ze spermatocytů I. typu prvním meiotickým dělením vznikají haploidní spermatocyty II. typu, jejichž jádro už není tak velké, je ale velmi obtížné oba typy porovnat, jelikož spermatocyty II. typu jsou v seminiferním epitelu vidět jen krátce. Druhým meiotickým dělením dávají vznik 4 spermatidám, kulatým buňkám s haploidní sadou chromozomů.

Proces, kdy se z kulovitých spermatid stávají podlouhlé spermie, se nazývá spermiogeneze. Při ní ve spermatidách dochází k redukci cytoplazmy, syntéze akrozomu z Golgiho aparátu a kondenzaci a zploštění jádra. U pěvců jádro nabývá spirálovitého tvaru kopírující tvar hlavičky díky svazkům mikrotubulů, u akrozomu je přesný mechanismus dosud nejasný (Fawcett *et al.* 1971). V časně fázi spermatidy je jaderný chromatin ještě kondenzovaný, postupně se rozvolňuje a později opět kondenzuje (Góes & Dolder 2002). Mitochondrie, do té doby lokalizované v postnukleární oblasti, začnou fúzovat dohromady, až vytvoří dlouhý řetězec obtočený podél axonemy bičíku (Fawcett *et al.* 1971; Góes & Dolder 2002). Formování bičíku je iniciováno díky centriole, párové organele umístěné za jádrem, která tvoří bazální tělísko bičíku. Skládá se z kratší proximální části, která je blíže jádru a distální delší části, která tvoří samotný základ bičíku: vystupují z ní dva centrální párové mikrotubuly tvořící základ axonemy. Na několika starších studiích bylo demonstrováno, že proximální centriola u pěvců zaniká, recentní studie hýla obecného (*Pyrrhula pyrrhula*) a snovače žlutého (*Ploceus velatus*) ale proximální centriolu detekovaly jak ve spermatidách, tak ve zralých spermích (Góes & Dolder 2002; Birkhead *et al.* 2006; Aire & Ozegbe 2012).

Zralé spermie jsou z lumen semenotvorného kanálku varlete sítí kanálků *rete testis* a proximálním eferentním kanálkem transportovány do nadvarlete. Tento proces je u ptáků v porovnání se savci velmi rychlý, např. spermii křepelky japonské to trvá jeden den, zatímco spermii potkana obecného osm dní. Celý proces spermatogeneze pak u křepelek trvá 14-15 dní, u potkanů 50 dní (Robb *et al.* 1978; Clulow & Jones 1982). U savců dochází v nadvarleti k maturaci spermií, kdy se stávají pohyblivými, dochází ke strukturním modifikacím, mění se složení cytoplazmatické membrány. U ptáků mohou být spermie pohyblivé a schopné oplození již ve varleti, studií je ale zatím málo a zaměřují se primárně na ptáky z řádu hrabavých. U křepelky je schopno navázat se na perivitelinní membránu oocyty (analog *zona pellucida* savců) a akrozomální reakce až 90 % spermií z varlete. Studie nicméně odhalila, že pouze 20 % spermií odebraných z varlete bylo motilních. Průchod nadvarlem tak u křepelky zvyšuje rychlost a podíl motilních spermií v ejakulátu, za což by mohl být zodpovědný protein hemoglobin, který je v nadvarleti syntetizován (Nixon *et al.* 2014). Spermie kura domácího ovšem postrádají motilitu ještě v nadvarleti. Motilita je u nich teplotně závislá a vyžaduje snížení teploty ze 40 °C na 30 °C, ke kterému dochází až při ejakulaci a přenosu do samičí kloaky (Ashizawa & Sano 1990).

Z nadvarlete spermie pokračují do chámovodu (*vas deferens*), který je zakončen v kloace. Spermie jsou ukládány na konci chámovodu na kloakálním výčnělku, u pěvců v místě zvaném *seminal glomus*, u ostatních ptáků v *receptaculum ductus deferentis* (Jamieson 2007). Koncentrace spermií v *seminal glomus* u vrabce domácího (*Passer domesticus*) v období páření v průběhu dne klesá, rozdíl mezi ranním a večerním měřením činí až 85 %. *Seminal glomus* tak pravděpodobně slouží pouze jako jednodenní zásobárna spermií a produkce, transport a uložení nových spermií do něj probíhá v noci (Birkhead *et al.* 1994). Jeho velikost se také cyklicky mění, s nástupem období rozmnožování roste a po skončení hnízdní sezóny jeho velikost opět klesá (Chiba *et al.* 2011).

U savců musí spermie projít procesem kapacitace, která probíhá v reprodukčním traktu samice a teprve poté jsou schopné navázat se na *zona pellucida* oocyty a akrozomální reakce. Při kapacitaci dochází ke změnám proteinového složení na povrchu spermie, změnám v cytoplazmatické membráně i v cytoplasmě. U ptačích spermií ke kapacitaci nedochází a spermie jsou schopné akrozomální reakce a navázání na perivitellinní membránu oocyty ihned (Horrocks *et al.* 2000; Lemoine *et al.* 2008; Nixon *et al.* 2014). Kopulace u většiny ptačích druhů (97 %) probíhá přitisknutím jejich kloak. Výjimku tvoří běžci (*Paleognathae*) a vrubozobí (*Anseriformes*), kteří mají penis či hemipenis, tzv. intromittent organ (Briskie & Montgomerie 1997).

1.1.1 Morfologie ptačí spermie

Spermie patří mezi vysoce specializované buňky, které od jejich objevu v 18. století stále nepřestávají lidstvo fascinovat. Poprvé je pod vlastnoručně sestrojeným mikroskopem pozoroval dánský nadšenec, přírodovědec amatér a průkopník mikroskopie, Antoni van Leeuwenhoek v roce 1678, který zkoumal spermie žab, ryb a ptáků a jejich morfologickou variabilitu pečlivě zaznamenával kresbami. Jejich objev vyvolal řadu otázek, např. zda jsou za oplození odpovědny přímo spermie nebo semenná plazma. Odpověď se pokusil nalézt roku 1785 Lazzaro Spallanzani, italský kněz, psycholog a přírodovědec, který pracoval s vajíčky a spermiemi žab. Mylně ale dospěl k závěru, že hlavní roli při oplození hraje semenná plazma a teprve roku 1824 pravdu odhalili Jean-Louis Prévost a Jean Baptiste Dumas (podle Lopata 2009). Morfologická variabilita spermií zůstává jednou z největších záhad reprodukční biologie. Jejich variabilita mezi taxony je v porovnání s jakýmkoli jinými živočišnými buňkami mnohem větší (Calhim *et al.* 2007). Spermie se ale liší nejen na mezidruhové úrovni, ale také na vnitrodruhové-mezi jedinci i v rámci ejakulátu jednoho samce. Faktory ovlivňujícími tuto variabilitu mohou být způsob oplození (vnitřní či vnější), fylogeneze a již zmiňovaný postkopulační pohlavní výběr (Birkhead & Immler 2007).

Spermie ptáků se skládají ze dvou částí, hlavičky a bičíku (flagellum), které jsou pokryty plazmatickou membránou. Střední část (midpiece) je součástí bičíku. Morfologie

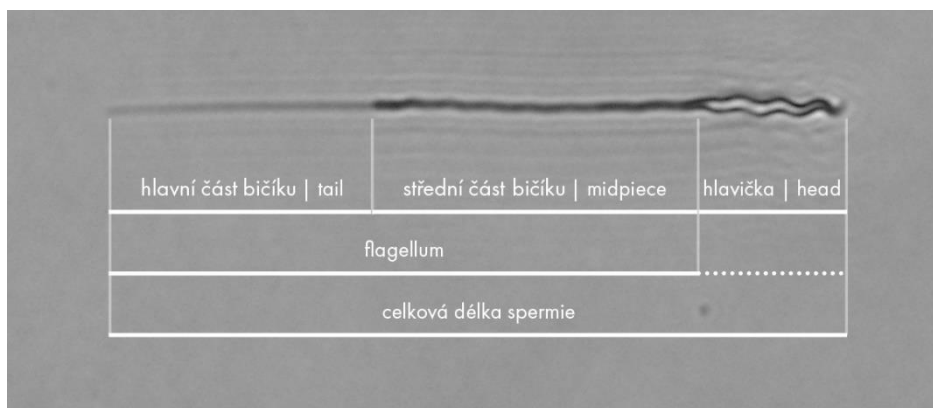
spermie je zobrazena na obrázku č. 1. Poměry jednotlivých částí a celková délka spermií se mezi druhy velmi liší, spermie mohou měřit od 50 μm až do 300 μm , přičemž se mezi druhy nejvíce liší délkou bičíku (Briskie & Montgomerie 1992).

Hlavička je dlouhá a u pěvců špičatá s typickým spirálovitým tvarem. Výjimkou jsou pouze spermie hýla obecného a jeho příbuzného endemita hýla azorského (*Pyrrhula murina*), které jsou kulovité (Birkhead *et al.* 2006; Lifjeld *et al.* 2013). Počet spirál na hlavičce se mezi druhy různí, drozd zpěvný (*Turdus philomelos*) má spermie v průměru s 2,3 otáčkami a rákosník zpěvný (*Acrocephalus schoenobaenus*) až se 4,6 otáčkami (Birkhead *et al.* 2006). Spermie ostatních ptačích taxonů mají obecně protáhlé hlavičky bez tohoto spirálovitého tvaru, podobné spermiím plazů, které se označují jako sauropsidní (Korn *et al.* 2000). Hlavička má redukovanou cytoplazmu. Uvnitř hlavičky se nachází jádro, které bývá protáhlého až spirálovitého tvaru (kopíruje tvar hlavičky), nese haploidní sadu chromozomů a akrozom. Ptáci mají určení pohlaví typu abraxas, tzn. že homogametičtí samci nesou chromozomy ZZ a samice jsou heterogametické s chromozomy ZW. Akrozom je modifikovaný sekreční váček v přední části hlavičky. Vzniká v pozdních fázích spermatogeneze z Golgiho aparátu a obsahuje lytické enzymy, např. akrosin a hyaluronidázu, které jsou nutné k průniku spermie skrze vaječné obaly *zona pellucida* a *corona radiata* či fúzi membrán spermie a vajíčka. Poměr jeho velikosti vůči jádru se u ptáků značně liší, od 0,3 u rorýse obecného (*Apus apus*) až po 4 u tangary ohnivě (*Piranga rubra*). Akrozom spermií některých druhů ptáků je zašpičatělý a vybíhá v hřebeny spirálovitého tvaru, v literatuře známé pod pojmem „acrosome keel“ (Jamieson 2007).

Střední část spermie je, co se týče délky, jednou z nejvariabilnějších komponent. U pěvců je tvořena krátkou proximální a dlouhou distální centriolou, u ostatních ptáků více centriolami, které jsou složeny z devíti trojic mikrotubulů (Birkhead *et al.* 2006; Aire & Ozegbe 2012). Mikrotubuly se uplatňují také při mitóze, kdy zajišťují pohyb jader od sebe. Centriolu spirálovitě obklopují mitochondrie tvořící tzv. mitochondriální helix. Helix je u pěvců tvořena pouze jedinou mitochondrií, u jiných taxonů i více, např. ve studii kura domácího jich spirálovitě obklopovalo střední část až 30 (Bakst & Howarth 1975; Aire 2014). Délka této mitochondriální helix se mezi druhy výrazně liší, od 3,1 μm u vrány černé (*Corvus corone*) až po 138,5 μm u konopky obecné (*Carduelis cannabina*), obecně je ale u pěvců dlouhá (Jamieson 2007). Výjimkou mezi pěvci s absencí této helix je hýl rudý a hýl azorský (Birkhead *et al.* 2006; Lifjeld *et al.* 2013).

Mitochondrie generují energii oxidativní fosforylací v podobě ATP (adenosintrifosfátu), který je podstatný pro pohyb bičíku. Přesná funkce spirálovitého tvaru mitochondriální helix zůstává zatím neobjasněna. Pravděpodobně slouží k zintenzivnění rotačního pohybu, kterým se spermie pohybují vpřed tím, že usnadňuje přenos energie i k distálním částem bičíku (Jamieson 2007). Tento rotační způsob pohybu je pro spermie pěvců typický, spermie se při něm otáčí kolem své osy a pohybuje se dopředu (Vernon & Woolley 1999). U spermií savců

k rotaci nedochází, pohyb spermie je vyvolán pohybem bičíku do stran. Pohyb bičíku je umožněn díky axonemě, která tvoří jeho osní vlákno. Je to útvar složený stejně jako centriola z mikrotubulů. Ty mají obvyklé uspořádání 9+2, 2 centrální a 9 dubletů koncentricky je obklopujících. Mikrotubuly jsou uvnitř duté a skládají se z podjednotek α -tubulinu a β -tubulinu. To jsou globulární proteiny, které se pevnými nekovalentními vazbami spojují, vytváří dimery, které se dále řetězí a vytváří tak protofilamenta. Stěnu jednoho mikrotubulu tvoří dohromady 13 protofilament. Pohyb bičíku je uskutečňován díky posunu dubletu mikrotubulů proti sobě, který je generován dyneinem, molekulovým motorem s ATPázovou aktivitou (Gibbons 1981).



Obrázek č. 1: Morfologie spermie zebřičky pestré. Zvětšeno 400x.

1.2 Kvalita ejakulátu

Fenotyp a funkčnost spermie jsou zásadními faktory ovlivňujícími reprodukční úspěch samce, na které působí vlivem postkopulačního pohlavního výběru silná selekce. V zájmu samce je maximalizovat kvalitu jeho ejakulátu např. pomocí zvýšení rychlosti pohybu, délky a životnosti spermií či jejich vzájemnou kooperací. Některé z těchto fenotypových vlastností se mohou u různých druhů vzájemně ovlivňovat, kdy např. u jednoho taxonu s rostoucí rychlostí pohybu spermií může klesat jejich životnost, zatímco u jiného rychlost pohybu na jejich životnost žádný vliv nemá. Některé fenotypové vlastnosti spermií mohou být dědičné, jiné mohou být ovlivněny vnějším prostředím (Birkhead *et al.* 2005; Mossman *et al.* 2009). Variabilitu fenotypu spermií také ovlivňuje intenzita kompetice spermií. Samci jsou schopni investovat do kvality spermií a ovlivnit celkové množství ejakulátu na základě kvality samice (Pitcher *et al.* 2005). Jedná se o tzv. strategickou alokaci, kterou samci používají při intenzivní kompetici spermií (Kilgallon & Simmons 2005). Pokud se totiž samice páří s více než jedním samcem, prioritou samce je zvýšit produkci, a hlavně zdatnost jeho spermií v ejakulátu. Jev je také znám pod pojmem fenotypová plasticita ejakulátu (Kelly & Jennions 2011).

1.2.1 Délka spermie

Průkopnickou studií vlivu kompetice spermií na jejich délku byla studie 28 druhů primátů a 14 druhů hlodavců. Testovala hypotézu, že delší spermie zvítězí v konkurenci nad

ostatními, protože budou rychlejší a dorazí tak k vajíčku dříve. Samci druhů, u nichž jsou samice promiskuitní a páří se s více samci skutečně měli delší spermie v porovnání s monogamními druhy. Délka spermií navíc pozitivně korelovala s rychlostí pohybu spermií (Gomendio & Roldan 1991). Tento vztah však novější studie nepotvrdily. Studie 31 druhů primátů našla pozitivní korelaci pouze mezi intenzitou kompetice spermií a délkou střední části spermie (Anderson & Dixson 2002). Ani tento vztah však nenašla studie celkem 83 druhů savců (Gage & Freckleton 2003).

Délka spermií může souviset s morfologií reprodukčního traktu samic. Samice některých druhů jsou schopny skladovat spermie ve specializovaných útvarech, tzv. skladovacích tubulech (SSTs-sperm storage tubules) i po dobu 10 týdnů. Mohou být ukládány ve více vrstvách, přičemž nejvíce spermií použitých nakonec samicí k oplození pochází od posledního samce, s nímž kopulovala, protože jeho spermie brání ostatním v uvolnění z tubulu. Byl také nalezen pozitivní vztah mezi délkou spermií a délkou samičích skladovacích tubulů u 20 druhů pěvců. Údaje tak naznačují, že by v minulosti mohlo dojít ke koevoluci samčích gamet a samičích skladovacích tubulů (Briskie & Montgomerie 1993; Lüpold *et al.* 2016). Také samice bezobratlých ukládají spermie do skladovacích tubulů. Samice octomilek (*Drosophila melanogaster*) přednostně ukládají dlouhé spermie, při selekci samic s delšími tubuly začali i samci tvořit delší spermie (Miller & Pitnick 2002; Lüpold *et al.* 2016). Jejich délka se u octomilek pohybuje v rozmezí 0,32-58,3 mm, spermie tak může být i 10x delší, než je celková délka těla samce (Pitnick *et al.* 1995). Délka spermií je u octomilek dědičná (Lüpold *et al.* 2016). S délkou spermie ovšem negativně koreluje počet vyprodukovaných a ejakulovaných spermií (Pitnick 1996).

U zebříček pestrých je rychlost pohybu spermií dědičná (Mossman *et al.* 2009). Práce Bennison *et al.* 2015 ukazuje, že rychlost pohybu je u nich pozitivně korelována s délkou spermie, kdy samci s delšími spermiemi zplodí více potomků (až 64 %) v porovnání se samci s kratšími spermiemi (36 %). Podstatnou roli také hrají poměry délek jednotlivých částí spermie, kdy rychlejší jsou spermie s kratší hlavičkou v poměru k bičíku. Delší hlavička by mohla při pohybu zvyšovat odpor (Mossman *et al.* 2009). Délka jednotlivých částí spermie, tj. hlavičky, střední a hlavní části bičíku je u zebříček také dědičná (Birkhead *et al.* 2005). V délce spermií existuje mezi samci velká variabilita, obvyklá délka se pohybuje mezi 50-80 μ m (Birkhead *et al.* 2005; Immler *et al.* 2012). Důvodem tak velké variability je pravděpodobně nízká intenzita kompetice spermií s malou selekcí na jejich fenotyp (Birkhead *et al.* 2005). Recentní studie navíc odhalila, že rychlost pohybu sice roste s délkou spermie, ale jen do určité délky-u nejdelších spermií rychlost naopak klesá (Bennison *et al.* 2016). Obecně u pěvců se vzrůstající délkou hlavní části bičíku roste i délka střední části, spermie s nejdelšími hlavními částmi bičíku zebříček ovšem mají střední část překvapivě krátkou a vztah mezi nimi je u zebříček tedy nelineární (Birkhead *et al.* 2005; Bennison *et al.* 2016).

1.2.2 Rychlost pohybu a životnost spermií

Teorie předpokládá, že delší spermie budou vykazovat vyšší rychlost pohybu, dostanou se k vajíčku rychleji a v kompetici spermií tak zvítězí (Snook 2005; Lüpold *et al.* 2009). V praxi se však výsledky studií liší. U některých druhů se s intenzivnější kompeticí spermií rychlost spermií zvyšuje, celková délka spermie však není jediným faktorem ovlivňujícím jejich rychlost (Nascimento *et al.* 2008; Fitzpatrick *et al.* 2009). Důležitými mohou být i poměry různých částí spermie či její celková morfologie (Helfenstein *et al.* 2010a).

Modelovým druhem jedné z prvních studií odhalující vliv velikosti spermií na jejich rychlost bylo háďátko obecné (*Cenorhabditis elegans*), u kterého jsou větší spermie produkované samci (v populaci tvoří 0,1 %) až 10x rychlejší než menší spermie produkované hermafrodity (tvoří 99,9 % populace) (LaMunyon & Ward 1998). Výzkum cichlidovitých ryb obývajících jezero Tanganyika ukázal, že samci druhů čelících vyšší intenzitě kompetice spermií produkují delší a rychlejší spermie (Fitzpatrick *et al.* 2009). Rychlejší spermie ale například u lososa obecného (*Salmo salar*) mají kratší životnost (Gage *et al.* 2004). Rychlost pohybu spermií je zásadní také pro kura domácího a krocany divoké (*Meleagris gallopavo*), jelikož samice u těchto druhů uchovávají spermie ve skladovacích tubulech. Ty obsadí rychleji spermie s větší motilitou a samec, který takové spermie produkuje, zplodí až 73,3 % mláďat (Donoghue *et al.* 1998; Birkhead *et al.* 1999). Pro rychlost pohybu spermií vrabce domácího je zásadní délka spermie, kdy delší spermie vykazují kromě vyšší rychlosti také delší životnost. Kromě celkové délky u nich ovlivňuje rychlost pohybu také poměr hlavičky, kdy se nejrychleji pohybují spermie s krátkou hlavičkou v poměru k bičíku (Helfenstein *et al.* 2010a). Dlouhé spermie lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) po ejakulaci vykazují stejnou rychlost pohybu jako kratší spermie, po 10 minutách jejich rychlost ale výrazně klesá a rychleji se poté pohybují kratší z nich (Lifjeld *et al.* 2012). Rychlost pohybu spermií u primátů ovlivňuje jejich pářící systém. Nejrychlejší spermie mají samci makaka rhesus (*Macaca mulatta*) a šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*), kteří jsou velmi promiskuitní, naopak nejpomalejší spermie mají samci gorily západní (*Gorilla gorilla*), kteří mají harém samic a neprobíhá tak u nich kompetice spermií s konkurenčními samci (Nascimento *et al.* 2008).

U některých druhů můžeme pozorovat tzv. kooperaci spermií, kdy příbuzné spermie (pocházející od stejného samce) spolupracují. Díky morfologickým adaptacím v oblasti hlavičky tvoří páry až shluky stovek spermií, které se mohou pohybovat rychleji než osamocené nebo menší shluky spermií (Pizzari & Foster 2008). Toto bylo dokázáno u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) a potkana obecného, jejichž spermie se shlukují díky apikálním háčkům na hlavičkách a pohybují se rychleji v porovnání s jednotlivými spermiemi (Moore *et al.* 2002; Immler *et al.* 2007). Spermie myši domácí (*Mus musculus*) také vytváří shluky, žádný efekt na jejich rychlost ovšem nemají (Immler *et al.* 2007).

Zásadní vliv na úspěšnost oplození může mít životnost spermie, což je časový interval, po který spermie vykazuje pohyb. Hlavním zdrojem energie pro její pohyb je nukleotid ATP (adenosintrifosfát). Ve spermiu vzniká při oxidativní fosforylaci v mitochondriích lokalizovaných v přední oblasti střední části spermie a při glykolýze v enzymech vázaných na hlavní část bičíku (Ford 2006). ATP je hydrolyzou rozložen na ADP (adenosindifosfát) a Pi (fosfát), kdy dochází k uvolnění energie (Vilar *et al.* 1980). Koncentrace ATP a počet mitochondrií se v mezidruhové studii savců zvyšovaly spolu s délkou a objemem střední části spermie, které lineárně rostly s délkou hlavní části bičíku (Cardullo & Baltz 1991). Hypotéza tedy předpokládá, že spermie s delší střední částí budou mít více mitochondrií k produkci ATP pro pohyb bičíku (Cardullo & Baltz 1991; Anderson & Dixson 2002). U primátů objem střední části rostl spolu s intenzitou kompetice spermií, měřenou jako relativní hmotnost varlat, objem střední části je tak zřejmě ovlivněn postkopulačním pohlavním výběrem (Anderson & Dixson 2002). Závěry dalších studií zůstávají nicméně zatím nejednoznačné. V mezidruhové studii pěvců měly spermie s delší střední částí skutečně vyšší hladiny intracelulárního ATP, na jejich rychlost pohybu však tyto vyšší koncentrace neměly žádný efekt (Rowe *et al.* 2013). Výzkum spermií hlodavců ovšem pozitivní vztah mezi koncentrací ATP a rychlostí potvrdil. Koncentrace ATP navíc, stejně jako ve studii primátů, stoupala s intenzitou kompetice spermií (Tourmente *et al.* 2013). Překvapivý výsledek přinesla studie zebřiček, kdy byl mezi délkou střední části spermie a koncentrací ATP nalezen negativní vztah. Nejvyšší koncentraci ATP tak vykazovaly spermie s nejkratší střední částí, obsah ATP navíc s rychlostí nesouvisel (Bennison *et al.* 2016). Vztah mezi délkou střední části spermie, obsahem ATP a jejich vlivem na rychlost pohybu tak patrně bude komplexní a vyžaduje další výzkum.

1.2.3. Abnormality spermií

Běžným fyziologickým jevem při spermatogenezi a spermiogenezi je vznik určitého množství spermií vykazujících morfologická poškození. Procento abnormálních spermií v ejakulátu se může zvyšovat vlivem nepříznivých podmínek, např. při vystavení organismu toxinům a patogenům a může tak negativně ovlivnit fertilitu samce (Ackerman *et al.* 1999). Spermie mohou mít např. deformovaný tvar hlavičky či jim hlavička může zcela chybět, ve střední části spermie mohou být detekovány vakuoly, hlavní část bičíku může být příliš krátká, stočená či se může vyskytovat i více bičíků najednou (Ackerman *et al.* 1999; Aziz *et al.* 2004; Kubo-Irie *et al.* 2005). Při působení oxidačního stresu u myši vykazovalo abnormální morfologii bičíku až 78 % spermií (Tajaddini *et al.* 2014). Ke zvýšenému podílu abnormálních spermií v ejakulátu vede také křížení mezi příbuznými jedinci, inbreeding (Gage *et al.* 2006).

Abnormální spermie jsou spolu se stárnoucími či nezralými spermii z ejakulátu odstraňovány při procesu spermiofagie. Spermiofagie (také spermatofagie) představuje fagocytózu spermií a jejich fragmentů zprostředkovanou makrofágy, Sertoliho buňkami a buňkami epitelu nacházejícími se v reprodukčním traktu samců. U savců probíhá spermiofagie

hlavně v semenotvorných kanálcích, *rete testis*, proximálním eferentním kanálku, v rozšířeném místě chámovodu zvaném *ampulla* a semenných váčcích (Holstein 1978; Murakami *et al.* 1978). U kura domácího byla zdokumentována spermiofagie zejména v *rete testis* a proximálním eferentním kanálku (Aire 2000). U pěvců probíhá fagocytóza spermií také v *seminal glomus*, kde jsou kromě imotilních či spermií vykazujících morfologická poškození absorbovány ještě všechny skladované a dosud nejakulované spermie po skončení reprodukčního období (Chiba *et al.* 2011).

1.3. Reprodukční cyklus ptáků a morfologie varlat

U většiny divokých a některých domestikovaných ptačích druhů dochází během roku k cyklickým změnám velikosti varlat v závislosti na reprodukčním období. Tyto změny jsou fyziologickou odpovědí neuroendokrinního systému na měnící se podmínky vnějšího prostředí. Reprodukční cyklus ptáků ovlivňuje zejména fotoperioda, teplota, množství srážek a s ním související dostupnost potravy a dostatek vhodných míst k hnízdění. V době rozmnožování mohou varlata až několikanásobně zvětšit svůj objem (Dawson *et al.* 2001). Toto zvětšení je způsobeno prodloužením semenotvorných kanálků a zvýšením počtu intersticiálních buněk mezi nimi (Jamieson 2007). Velikost varlat měřená jako jejich relativní hmotnost je také znakem intenzivní kompetice spermií, která koreluje s produkcí spermií (Møller & Briskie 1995; Pitcher *et al.* 2005). Intenzivní kompetici spermií jsou u ptáků vystaveni především samci druhů s vysokou frekvencí mimopárových paternit, např. strnad pestrý (*Calcarius pictus*) a modropláštník modrofialový (*Malurus splendens*) (Møller & Briskie 1995).

Reprodukční cyklus ptáků rozlišujeme na fázi reprodukční, involuční a regenerační. Během reprodukční fáze jsou buňky epitelu semenotvorných kanálků maximálně diferenciovány, intersticiální tkáň mezi kanálky je kompaktní a tenká. Produkce spermií, výška semenotvorného epitelu a průměr semenotvorných kanálků dosahují nejvyšších hodnot, lumen semenotvorného kanálku je prostorné a vyplněné tekutinou. Hladiny krevních hormonů FSH, LH a T jsou na svých maximech. Poté následuje involuční fáze, kdy dochází k postupnému poklesu produkce spermií, a nakonec k úplnému zastavení spermatogeneze. Výjimkou jsou pouze některé domestikované druhy, u kterých probíhá reprodukční fáze během celého roku (Jamieson 2007). Hlavním spouštěcím faktorem pro nástup involuční fáze je zkrácení dne, dochází ke snížení syntézy melatoninu epifýzou, které indukuje nárůst GnIH (Ubuka *et al.* 2005). Velikost varlat se snižuje, což je způsobeno masivní apoptózou Sertoliho buněk, spermatogonií a spermatocytů v semenotvorných kanálcích, jejich průměr se zmenšuje, lumen získává nepravidelný tvar a často invaduje do zárodečného epitelu. Intersticiální tkáň se z kompaktní stává houbovitou a nabývá na objemu, dochází zde k apoptóze Leydigových buněk (Aire 1997). Regenerační fáze tkáně varlat a příprava na další reprodukční období pak nastává působením gonadotropinů sekretovaných adenohypofýzou (Jamieson 2007).

1.3.1. Vliv věku na velikost a asymetrii varlat

Velikost varlat ptáků se mění také s věkem, kdy obecně větší varlata mají starší jedinci v porovnání s mladšími (Graves 2004; Laskemoen *et al.* 2008). S věkem roste také asymetrie ve velikosti varlat, u starších samců může rozdíl ve velikosti mezi levým a pravým varletem činit i více než 40 % (Graves 2004). U slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) měli starší samci až o 38 % větší varlata v porovnání s mladými, avšak pohlavně dospělými samci. S vyšším věkem samců souvisí také jejich reprodukční úspěch, kdy při extrapárových kopulacích jsou v porovnání s mladšími úspěšnější ti starší. Rozdíly v délce spermií a jejich motilitě nalezeny nebyly, starší samci ale měli také větší velikost *seminal glomus* (o 15 %) a kloakálního výčnělku (o 23 %). Vyšší reprodukční úspěch tak mohou starší samci mít díky uskladnění většího množství ejakulátu, umožňující jim častější kopulace (Laskemoen *et al.* 2008).

Varlata u většiny ptačích druhů vykazují velikostní asymetrii, kdy levé varle je u dospělých jedinců zřetelně větší než pravé, menší varle je ale schopné produkce spermií (Møller 1994; Calhim & Birkhead 2009). Opačnou asymetrii najdeme u samců kukaček rodu *Centropus*, u nichž je naopak větší pravé varle. Levé varle může zcela chybět nebo být redukováno na rudimentární diskovitý útvar viditelný pouze pod mikroskopem, jako je tomu u kukačky černoprse (*Centropus grillii*) (Frey & Goymann 2009). Funkční význam asymetrie velikosti varlat zůstává nejasný. Podle kompenzační hypotézy je pro ptáky kvůli letu nákladné mít obě varlata velká, proto je výhodné investovat pouze do velikosti jednoho z nich. V případě poruchy jeho funkce by pak menší varle mohlo sloužit jako záloha (Møller 1994; Calhim & Birkhead 2009). U některých druhů však mohou mít varlata stejnou velikost, např. u kura domácího či vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) (Hocking 1992; Kempnaers *et al.* 2002). Navíc u kukačky černoprse rudimentární varle není schopno produkce spermií, výsledek studie je tedy v kontrastu s kompenzační hypotézou (Frey & Goymann 2009).

1.4. Tubulin

Jednu z hlavních složek tvořících cytoskelet buňky představují mikrotubuly. Jedná se o dlouhá, dutá vlákna o vnějším průměru 25 nm, jejichž hlavními stavebními jednotkami jsou globulární $\alpha\beta$ -tubulinové heterodimery, které spolu polymerizují. Tyto heterodimery představují dva strukturně velmi podobné polypeptidy, které jsou napříč eukaryotickými buňkami evolučně konzervovány. Vlákna vznikají skládáním $\alpha\beta$ -tubulinových heterodimerů do protofilament a spojením 13 protofilament vzniká stěna mikrotubulu.

Mikrotubuly mají celou řadu funkcí, udržují tvar a polaritu buňky, účastní se organizace buněčných organel, vnitrobuněčného transportu a signalizace, stavby mitotického vřeténka, telofázního tělíska (midbody) a chrání buňku před mechanickým stresem. Také zajišťují motilitu buňky, jelikož jsou součástí axonem, osních vláken řasinek a bičíků. Cytoskeletální proteiny savců byly lokalizovány také v hlavičce spermií, kde se podílí pravděpodobně nejen na

udržení jejího tvaru, ale také na regulaci kapacity a akrozomální reakce, procesů předcházejících a nutných k úspěšnému oplození. Tubulin byl detekován zejména v apikální akrozomální oblasti hlavičky, v tzv. perinukleární théce, části lokalizované mezi vnitřní akrozomální membránou a obalem jádra, v ekvatoriálním segmentu a postakrozomální oblasti hlavičky (Dvořáková *et al.* 2005).

Doposud bylo v eukaryotických buňkách objeveno celkem 7 členů tubulinové rodiny, kromě výše zmíněného α - a β -tubulinu se jedná o γ -tubulin, který je nezbytný pro nukleaci mikrotubulů a dále δ -, ϵ -, ζ - a η -tubulin, které se účastní tvorby centriol a bazálních tělísek (McKean *et al.* 2001). Mikrotubuly v buňce vytváří vysoce organizovanou síť vláken, která je v případě potřeby schopna změnit své uspořádání. Tato jejich dynamická schopnost je dána polární strukturou s odlišeným (+) a (-) koncem vlákna, asociací s různými regulačními proteiny a posttranslačními modifikacemi. Regulační proteiny jsou nezbytné ke štěpení mikrotubulů, čímž dochází ke vzniku nových (+) a (-) konců. Na (+) konci mikrotubulu jsou lokalizovány β -tubuliny, na (-) konci najdeme α -tubuliny (Nogales *et al.* 1999). V rámci α - a β -tubulinu mnoha eukaryotních organismů byla objevena celá řada jejich izoform kódovaných různými geny (Ludueña 1998). Exprese těchto izoform je tkáňově specifická, jejich počet se mezi různými druhy organismů liší a jejich exprese se mění také v průběhu ontogeneze.

1.4.1. Acetylce tubulinu

Od objevu mikrotubulů v 60. letech 20. století až dodnes byla popsána celá řada posttranslačních modifikací, které na α - a β -tubulinu probíhají. Posttranslační modifikace zásadně ovlivňují stabilitu mikrotubulů a jejich interakci s regulačními proteiny. Jedná se zejména o acetylaci, detyronizaci, polyglutamylaci a polyglycylaci (Song & Brady 2015). Ke všem dosud známým modifikacím α - a β -tubulinu dochází na jejich c-koncích, které jsou orientovány do cytoplazmy. Výjimkou je pouze acetylace na lysinu (Lys) 40 α -tubulinu (někdy označován také jako K40), který je orientován do lumen mikrotubulárního vlákna (Nogales *et al.* 1999).

Acetylace je dnes zřejmě nejstudovanější posttranslační modifikací tubulinu. První zmínku najdeme ve studii Dasgupta *et al.* (1983), která zkoumala vazebná místa pro kolchicin a vliv acetylace lysinových zbytků na ně. Acetylovaná tubulinová vlákna vykazovala při nižších teplotách vyšší odolnost proti depolymerizaci v porovnání s vlákny neacetylovanými (Dasgupta *et al.* 1983). Výzkum α -tubulinu v axonemě bičíku řasy *Chlamydomonas reinhardtii* odhalil, že se od ostatního α -tubulinu přítomného v buňce lišil acetylací ϵ -amino skupiny lysinu. Tento acetylovaný α -tubulin byl lokalizován téměř výhradně pouze v axonemě, zatímco cytoplazmatický α -tubulin acetylován nebyl (L'Hernault a Rosenbaum 1983; 1985). Brzy poté byl acetylovaný α -tubulin detekován také v buněčných kulturách savců, zejména v axonemách bičíků spermií, centriolách, primárních řasinkách, dělicím vřetenku, telofázním tělísku

a kinetochoru (Piperno *et al.* 1987). V axonemě spermie se podařilo signál se stejnou intenzitou lokalizovat po celé délce bičíku jak u myši, tak také u lidí (Fouquet *et al.* 1996; Prigent *et al.* 1996).

K acetylaci dochází pomocí enzymů acetyltransferáz (např. TAT1/MEC17, ELP3, ARD1–NAT1, NAT10, GCN5), které katalyzují navázání kyseliny octové na lysinové zbytky. Přesný mechanismus není ale vzhledem k orientaci Lys 40 α -tubulinu do lumen mikrotubulu znám (Song & Brady 2015). Tubulin acetyltransferáza (TAT1) je vysoce specifickou acetyltransferázou pro Lys 40, která acetyluje jak dimery, tak polymerované mikrotubuly (Maruta *et al.* 1986; Shida *et al.* 2010). U savců a hlístic je hlavní acetyltransferázou, a zároveň je také klíčovým proteinem pro acetylaci axonemálních mikrotubulů u bičíkatých organismů (Shida *et al.* 2010; Kalebic *et al.* 2013). Při absenci této tubulin acetyltransferázy byl u myši pozorován pokles acetylace Lys 40 α -tubulinu v různých tkáních. Pokles byl patrný zejména v řasinkových buňkách vejcovodu, bičíku spermií a axonech neuronů, místech s normálně vysokou mírou acetylace. Byla pozorována také nižší koncentrace spermií v ejakulátu a snížení fertility samců, která se projevila nižším počtem potomků. Jejich spermie navíc vykazovaly změny v morfologii a motilitě. Spermie měly kratší bičík a také podíl motilních spermií v ejakulátu byl nižší. Přítomnost tubulin acetyltransferázy (TAT1) byla tedy pro motilitu spermií zásadní (Kalebic *et al.* 2013).

Také studie lidských spermií odhalila možný vliv acetylace tubulinu na jejich motilitu. U pacientů s diagnostikovanou astenozoospermií, tzn. poruchou motility spermií exprese acetylovaného α -tubulinu v bičíku klesala směrem k jeho distálnímu konci. U mužů s normálními zdravými spermii byl ale signál uniformní po celé délce bičíku spermií. Také byly detekovány změny v expresi α -tubulinových izoform TUBA3C, TUBA4A a TUBA8, jejichž výskyt je tkáňově specifický pro varlata a spermie. U astenozoospermiků byla exprese izoform TUBA3C a TUBA8 v porovnání s expresí u mužů s normálními zdravými spermii snížena, naopak izoforma TUBA4A u zdravých jedinců detekována nebyla vůbec, ale u astenoozpermiků se přerušovaný signál objevoval po celé délce bičíku. Rozsah acetylace α -tubulinu je tedy pravděpodobně řízen transkripčně expresí či umlčením exprese konkrétních izoform, v případě astenozoospermiků zejména sníženou mírou exprese izoformy TUBA3C (Bhagwat *et al.* 2014). Acetylace tubulinu tak může být klíčovým faktorem pro motilitu spermií a vhodným markerem k detekci jejich kvality. Přesná funkce acetylace v buňkách však zůstává stále neobjasněna. Ačkoliv některé výzkumy připisovaly acetylaci hlavně stabilizační funkci, kdy byly acetylované mikrotubuly odolnější proti depolymerizaci indukované nízkou teplotou či chemicky za použití nokodazolu a taxolu (Dasgupta *et al.* 1983; L'Hernault a Rosenbaum 1985; Piperno *et al.* 1987), jiné studie tuto hypotézu nepotvrdily (Maruta *et al.* 1986; Kalebic *et al.* 2013). Výzkum acetyltransferázy TAT1 u savců dokonce prokázal její schopnost destabilizovat mikrotubuly nezávisle na její acetyltransferázové aktivitě (Kalebic *et al.* 2013). Na stabilitu

mikrotubulů má tedy vliv nejen acetylace a interakce s TAT1, ale i další, zatím neobjasněné funkce této acetyltransferázy. Acetylace mikrotubulů by také mohla sloužit jako marker k nasednutí dalších faktorů, které by mohly mít stabilizační funkci a je proto potřeba další výzkum týkající se této problematiky.

1.5. Spermie a oxidační stres

Spermie jsou velmi citlivé k rozmanitým vlivům vnějšího prostředí, negativní vliv na ně může mít např. vysoká teplota, toxiny, patogeny či infekce. Tyto faktory vyvolávají v organismu zvýšenou míru oxidačního stresu. Ten může u spermií způsobit změny v jejich fenotypu, motilitě, vyvolat nevratné poškození DNA a zvýšit tak podíl abnormálních spermií v ejakulátu. Oxidační stres je definován jako porucha redoxní rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty v buňce, kdy se rovnováha vychýlí ve prospěch oxidantů (Sies 1997). K tomu může dojít při zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS-reactive oxygen species) či sníženou antioxidační ochranou organismu (von Schantz *et al.* 1999).

ROS představují molekuly s relativně krátkou životností, které vznikají v aerobních buňkách přirozeně jako vedlejší produkty metabolismu. Jsou označovány také jako volné kyslíkové radikály. Jejich existence byla objevena poměrně nedávno, v roce 1954, kdy byla navržena hypotéza, že představují vedlejší produkty enzymatických reakcí probíhajících v živých buňkách a mohou přispívat k buněčnému poškození, mutagenезi, rakovinnému bujení a buněčnému stárnutí (Harman 1956; Wiseman & Halliwell 1996). Reaktivní kyslíkové formy mohou také vznikat působením různých stresových faktorů, např. UV a ionizujícího záření, chemoterapeutiky, vysoké teploty, pesticidů, organických rozpouštědel či průmyslovým znečištěním životního prostředí (Finkel & Holbrook 2000). Kromě reaktivních forem kyslíku v organismu vnikají také reaktivní formy dusíku (RNS-reactive nitrogen species) (Wiseman & Halliwell 1996).

1.5.1 ROS-vznik a funkce

Reaktivní formy kyslíku představují skupinu kyslíkatých derivátů, které zahrnují superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíku, singletový kyslík a ozon (Wells *et al.* 1997). Jsou velmi reaktivní a ochotně v buňce reagují s dalšími organickými molekulami, ohroženy jsou zejména lipidy, proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny. Mezi největší zdroje volných radikálů v buňce patří hlavně mitochondrie, vzniká v nich až 90 % z jejich celkového množství. Dalším zdrojem jsou membránově vázané enzymy a peroxisomy (Balaban *et al.* 2005; Starkov 2008). Při buněčné respiraci se v elektronovém transportním řetězci mitochondrií redukuje dvouatomová molekula kyslíku za vzniku dvou molekul vody. Za fyziologických podmínek je však 0,2 - 2 % kyslíku redukováno neúplně za vzniku kyslíkových radikálů (St-Pierre *et al.* 2002; Starkov 2008). Před oxidačním stresem se buňky chrání antioxidačními systémy, pokud ale intenzita oxidační zátěže vzroste, může dojít k poškození a apoptóze buňky

a následnému poškození tkání (Wells *et al.* 1997; von Schantz *et al.* 1999). Oxidační stres je také často spojován se vznikem různých onemocnění a patologických stavů, zejména Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou nemocí, roztroušenou sklerózou, diabetem mellitus, kardiovaskulárními a nádorovými onemocněními a buněčným stárnutím (Harman 1956; Fiers *et al.* 1999; Finkel & Holbrook 2000).

Ačkoliv reaktivní kyslíkové formy pravděpodobně nesou svůj podíl na všech nebo alespoň některých z těchto onemocnění, jejich produkce je nezbytná k udržení homeostázy, fungují jako regulátory buněčného růstu, diferenciaci, proliferace a apoptózy buněk a jako signální molekuly v komunikaci mezi mitochondriemi a cytosolem (Finkel & Holbrook 2000; Nemoto *et al.* 2000). Účastní se také tzv. respiračního vzplanutí, obranné imunitní reakce zprostředkované leukocyty a makrofágy, při které vzniká kyselina chlorná (HClO), jeden z nejsilnějších fyziologických oxidantů se silnými antimikrobiálními účinky (Hampton *et al.* 1998).

1.5.2 ROS a poškození biomolekul

Jak už bylo zmíněno výše, mezi oxidačním stresem nejvíce ohrožené komponenty patří zejména lipidy, proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny. Působením reaktivních kyslíkových forem dochází k peroxidaci lipidů nacházejících se v plazmatických a mitochondriálních membránách buněk, změnám jejich fluidity a propustnosti (Gutteridge 1995). Při peroxidaci lipidů také může vznikat malondialdehyd, jenž je toxický a způsobuje poruchy funkce a změny životnosti proteinů (Pamplona 2008). Porucha funkce proteinů může vést k chybné buněčné signalizaci či spuštění apoptózy (Davies *et al.* 1999). Také oxidační poškození sacharidů (např. glukózy, fruktózy, deoxyglukózy) je často následováno poškozením proteinů, jejich hromaděním a znemožněním jejich degradace v proteazomech a lysozomech. Bylo navíc zjištěno, že toto hromadění proteinů souvisí s tvorbou amyloidních plaků při Alzheimerově chorobě (Rajendran *et al.* 2009).

Oxidační stres také ohrožuje nukleové kyseliny, ribonukleovou (RNA) i deoxyribonukleovou (DNA) (Wiseman & Halliwell 1996). Typicky dochází k modifikaci jejich purinových a pyrimidinových bází či cukerných zbytků, výjimkou ale není i rozštěpení celého řetězce (Tremellen 2008). RNA je k poškození náchylnější ještě o něco více než DNA, jelikož ji tvoří pouze jedno vlákno, které není chráněno histony a dalšími vyššími chromatinovými strukturami, které hrají významnou roli při jeho ochraně (Ljungman & Hanawalt 1992). Míra poškození DNA závisí také na její lokalizaci v buňce, kdy vyšší míře oxidačního poškození čelí DNA mitochondriální v porovnání s jadernou DNA, vzhledem k lokalizaci elektronového transportního řetězce v mitochondriích (Yakes & Van Houten 1997).

1.5.3. ROS a poškození spermií

Volné kyslíkové radikály jsou produkovány jak spermiemi, tak leukocyty přítomnými v ejakulátu (Aitken 1999). Spermie před jejich škodlivým účinkem chrání rozmanité antioxidační mechanismy. Ty jsou v jiných buňkách součástí cytoplazmy, ale vzhledem k redukci cytoplazmy u spermií jsou součástí seminální plazmy. Jedná se např. o superoxid dismutázu, katalázu, glutathionperoxidázu, kyselinu močovou, thioly a vitamín C a E (Sies 1993; Aitken 1999; von Schantz *et al.* 1999). Plazmatická membrána spermií je bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, které oxidují snadněji v porovnání s mononenasycenými a nasycenými mastnými kyselinami (Tremellen 2008). To je spolu s faktem, že spermie nemají dostatečné opravné mechanismy činí zvláště citlivými k oxidačnímu poškození (Aitken & Clarkson 1987; Alvarez *et al.* 1987).

Volné kyslíkové radikály konkrétně mohou poškodit cytoskelet, axonemu bičíku i mitochondrie spermií, což může vést ke snížené motilitě (De Lamirande & Gagnon 1992). Mohou také způsobit neschopnost fúze spermie s oocytem či poškodit jadernou DNA vedoucí k poruchám ve spermatogenezi. Spermie neschopné fúze s oocytem vykazovaly až 40x vyšší hladiny volných kyslíkových radikálů v porovnání s normálně funkčními spermiemi (Aitken & Clarkson 1987). Navíc bylo zjištěno, že ejakuláty mužů s poruchou plodnosti jsou až ve 40 % případů postiženy zvýšenou hladinou volných kyslíkových radikálů, což je spolu s delecemi na dlouhém nerekombinujícím raménku chromozomu Y může řadit mezi hlavní příčiny způsobující neplodnost (Iwasaki & Gagnon 1992; Roberts 1998).

Snížení počtu motilních spermií v ejakulátu nastalo ve studii Boujbiha *et al.* (2009), která k indukci oxidačního stresu u potkanů používala 2 koncentrace chloridu rtuťnatého přidávaného do vody (skupina A 4 mg/kg a skupina B 8 mg/kg) po dobu 90 dní. Největší rozdíl v motilitě spermií byl patrný 7. den experimentu. Ejakuláty samců z kontrolní skupiny vykazovaly 66 % motilních spermií, samců ze skupiny A 36 % a samců ze skupiny B pouze 28 % motilních spermií. V průběhu studie však u obou experimentálních skupin procento motilních spermií v ejakulátu opět stouplo, 30. den experimentu měla kontrolní skupina 73 %, skupina A 72 % a skupina B 71 % motilních spermií v ejakulátu. Poslední, 90. den experimentu, byly mezi skupinami opět velké rozdíly, kontrola měla v ejakulátu 74 %, skupina A 58 % a skupina B 50 % motilních spermií. Před započítáním experimentu měli všichni samci v ejakulátu průměrně 47 % motilních spermií. Oxidační stres tak sice celkově u skupiny A i B zapříčinil snížení počtu motilních spermií v ejakulátu oproti kontrole, v průběhu experimentu však u nich došlo k překvapivému nárůstu motilních spermií. Autoři studie ale žádné vysvětlení pro nárůst počtu motilních spermií v ejakulátu potkanů při podávání chloridu rtuťnatého v průběhu experimentu nezmiňují (Boujbiha *et al.* 2009).

Také u ptáků, např. u kachny divoké a sýkory koňadry (*Parus major*) byl pozorován vliv oxidačního stresu na sníženou motilitu a rychlost pohybu spermií (Helfenstein *et al.* 2010b; Peters *et al.* 2004; Losdat *et al.* 2011). Byla u nich také pozorována souvislost mezi intenzitou karotenoidního zbarvení zobáku či peří a kvalitou spermií (Peters *et al.* 2004; Helfenstein *et al.* 2010b; Losdat *et al.* 2011). Oxidační stres může být u ptáků vyvolán i příliš velkou velikostí snůšky, která nutí rodiče zvýšit energii vloženou do péče o potomstvo (Alonso-Alvarez *et al.* 2004b). Spermie intenzivněji zbarvených samců sýkory koňadry měly při působení oxidačního stresu vyšší rychlost (Losdat *et al.* 2011). Naopak spermie méně zbarvených jedinců vykazovaly zvýšené hladiny peroxidace lipidů, která negativně korelovala s kvalitou spermií a v ejakulátu měli menší procento motilních spermií (Helfenstein *et al.* 2010b). Tyto studie jsou v souladu s redox-based PLFH hypotézou, kdy intenzivněji zbarvení samci měli kvalitnější a lépe chráněné spermie před oxidačním stresem (Blount *et al.* 2001). Hypotézu PLFH ale například recentní metaanalýza nepotvrdila (Mautz *et al.* 2013). V kontrastu s ní je také studie na zebříčce pestré, v níž měli samci s intenzivněji zbarveným zobákem za působení oxidačního stresu sníženou motilitu spermií (Tomášek *et al.* 2017). Tento výsledek je tedy spíše potvrzením hypotézy o trade-off investic mezi kvalitou karotenoidních ornamentů a kvalitou spermií.

1.5.4. ROS a poškození tkáně varlat

Zvýšené hladiny oxidačního stresu způsobují poškození nejen zralých spermií, ale vyvolávají také patologické změny přímo ve tkáni varlat. Studie oxidačního stresu používají k jeho indukci v laboratorních podmínkách různé látky, nejčastěji xenobiotika či těžké kovy. Ve tkáni varlat myši způsobil oxidační stres narušení struktury semenotvorného epitelu, byly zde detekovány četné dutinky (vakuoly) a zárodečné buňky s denzními jádry. V porovnání s kontrolní skupinou byl počet semenotvorných kanálků s diferenciovanými zárodečnými buňkami významně snížený. Studie měřila také hladinu testosteronu, který je sekretován Leydigovými buňkami a který je pro spermatogenezi nezbytný, také jeho množství bylo u experimentální skupiny snižené (Sajjadian *et al.* 2014). Oxidační stres může způsobit celkové narušení organizační struktury semenotvorného epitelu vedoucí až k absenci spermatogeneze v některých semenotvorných kanálcích (Yuan *et al.* 2017). U potkanů bylo takto postiženo až 70 % jejich semenotvorných kanálků, které v lumen neměly přítomny zralé spermie (Boujbiha *et al.* 2009).

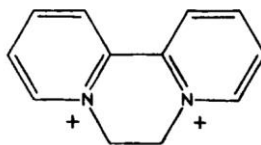
Indukovat oxidační stres může i hyperglykémie při diabetu. U potkanů měly zárodečné buňky v jednotlivých stádiích spermatogeneze narušenou organizační strukturu, jejich počet byl nižší, stejně tak počet Sertoliho buněk byl redukován. V lumen kanálku byla patrná nekróza buněk, epitel semenotvorných kanálků byl přerostlý a zhuštěný, intersticiální tkáň také vykazovala zhuštěnou strukturu (Dkhil *et al.* 2016). V intersticiální tkáni se také důsledkem oxidačního stresu může vyskytovat edém s bílými krvinkami, tzv. eozinofily (El-Rahman & El-

Shahat *et al.* 2009). Starší studie u diabetických potkanů detekovala snížený průměr semenotvorných kanálků a zvýšenou tloušťku jejich bazální laminy (Guneli *et al.* 2008). V kontrastu s tím je další studie potkanů, u nichž byl oxidační stres indukován chloridem rtuťnatým ve 2 různých koncentracích. Důsledkem u obou skupin byl pokles tloušťky bazální laminy v porovnání s kontrolou (Boujbiha *et al.* 2009). Výjimkou při zvýšených hladinách oxidačního stresu není ani odchlípení bazální laminy od semenotvorného epitelu (El-Rahman & El-Shahat *et al.* 2009).

Také u ptáků dochází při zvýšených hladinách oxidačního stresu k podobným příznakům, studií ale není mnoho. Například u kura domácího způsobil výskyt edémů, nekrotické tkáně, masivní apoptózu zárodečných buněk v semenotvorném epitelu a vedl téměř k úplnému zastavení spermatogeneze (Liu *et al.* 2013). Stejně jako u myši způsobil oxidační stres u křepelek výskyt četných vakuol v semenotvorném epitelu a snížení počtu zárodečných buněk (Tokumoto *et al.* 2013).

1.5.5. Diquat dibromid a toxicita

Diquat dibromid (1,1'-ethylen-2,2'-dipyridylium dibromid) je chemická látka, která produkuje za podmínek *in vivo* superoxidový radikál a tím působí v organismu jako prooxidant, tzn. zvyšuje oxidační stres. Strukturní vzorec diquatu je zobrazen na obrázku č. 2 (Stancliffe & Pirie 1971). Diquat patří mezi bipyridyly, je dobře rozpustný ve vodě a používá se především v zemědělství jako neselektivní kontaktní herbicid k desikaci polních plodin, hubení plevelů, ovocných sadech, vinicích a vodních nádržích k odstranění nežádoucí vegetace a řas. Je součástí řady přípravků, např. Dikvat - 200 SL, KeMiChem-Diquat 200 SL, REGLONE 200 SL, REGO. Napadá nadzemní části rostlin, kdy reaktivní formy kyslíku vznikají při fotosyntéze, poškozují buněčnou membránu rostlin a dochází tak k opadu listů (Alexeef 2000). Pesticidy, zahrnující herbicidy, insekticidy a fungicidy jsou v zemědělství velmi využívány, jejich roční spotřeba na světě přesahuje více než 2,5 milionu tun (van der Werf 1996). Takové množství má samozřejmě vliv nejen na životní prostředí, ale může ovlivňovat i zdraví živočichů.



Diquat, (1,1'-ethylene-2,2'-dipyridylium ion).

Obrázek č. 2: Strukturní vzorec diquatu. Převzato od Stancliffe a Pirie 1971.

Diquat prostupuje buněčné membrány hlavně difúzí a u savců je jen minimálně metabolizován, z největší části v játrech (Alexeeff 2000). Jelikož produkuje superoxidový radikál, může vést až k cytotoxicitě buněk (Stancliffe & Pirie 1971). Nejvíce ohroženými jsou zejména buňky jater, plic, ledvin a rohovky. Jaterní nekróza po perorálním podávání diquatu byla pozorována u laboratorních potkanů kmene Fischer, kteří vykazovali větší poškození jaterní tkáně v porovnání s kmenem Sprague-Dawley. Oba kmeny přitom byly vystaveny stejným dávkám diquatu (Smith *et al.* 1985). Také v novější studii potkanů kmene Fischer zaměřené na genovou expresi a metabolismus železa vykazovali potkani vystavení dávce diquatu zvýšenou hladinu volného železa v játrech. Toto nevázané dvojmocné železo představuje přechodný prvek, který může vést až k produkci hydroxylových radikálů a v játrech potkanů působilo hepatotoxicky. Tato hepatotoxicita byla stanovena podle zvýšené koncentrace alaninaminotransferázy (ALT) v krevní plazmě, která je spolehlivým ukazatelem poškození jaterních buněk (Higuchi *et al.* 2011). Byl zkoumán také vliv diquatu na genovou toxicitu v kostní dřeni myší. Diquat v kostní dřeni nezpůsobil přímo chromosomální aberace, nicméně souvisel se zvýšeným výskytem mikrojader v červených krvinkách. Ta pravděpodobně vznikají poškozením mitotického aparátu buňky, který může vést až ke ztrátě celých chromozomů (Dimitrov *et al.* 2006).

Vystavení působení diquatu také může zvyšovat riziko neplodnosti, spontánních potratů a vrozených vývojových vad. V *in vitro* studii myší byla embrya vystavena působení diquatu po dobu 96 hodin v takových dávkách, s jakými se mohou jejich březí matky setkat i v přírodních podmínkách, např. po požití kontaminované vody. Bylo nalezeno zvýšené procento apoptotických buněk u embryí vystavených diquatu (14,12 %) v porovnání s kontrolní skupinou (10,26 %) (Greenlee *et al.* 2004).

1.6. Charakteristika karotenoidů

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které v přírodě najdeme u bakterií, hub, rostlin i živočichů. Dnes je známo již více než 700 druhů různých karotenoidů (Fiedor & Burda 2014). Některé z těchto organismů si karotenoidy dokáží vyrobit sami, jako např. rostliny, řasy, fotosyntetizující bakterie i nefotosyntetizující eubakterie. Obratlovci však musí tyto látky přijímat a metabolizovat z potravy (Brush 1990). Organismus ale může přijmout pouze určité množství, nadbytek karotenoidů je ukládán do zásobních orgánů (např. jater a svalů) nebo vylučován (Brush & Power 1976; Alonso-Alvarez *et al.* 2004b). Živočichové je používají jako pigmenty pro svou ornamentaci důležitou při pohlavním výběru, pro ochranu organismu před oxidačním poškozením, pro mezibuněčnou komunikaci a při imunitní odpovědi (Olson & Owens 1998; von Schantz *et al.* 1999; Blount *et al.* 2003). Jsou důležitým prekurzorem vitamínu A. Ten je důležitý pro proliferaci buněk a nezbytný pro vznik rodopsinu, zrakového pigmentu (Hennekens *et al.* 1986). U rostlin jsou karotenoidy syntetizovány a skladovány

v plastidech, jsou součástí fotosyntetických systémů a mohou mít ochrannou funkci (Siefermann-Harms 1987).

Chemicky jsou karotenoidy řazené mezi izoprenoidy. Jsou to lineární, v tucích rozpustné molekuly s velmi dlouhými řetězci, které se dále rozdělují na karoteny a xantofyly (Hill 2002). Karoteny jsou nepolární uhlovodíky, jejichž molekula není substituovaná kyslíkem a mohou mít provitaminovou funkci. Patří mezi ně např. β -karoten. Xantofyly naopak kyslík obsahují a provitaminová aktivita u nich nalezena nebyla. Patří sem např. lutein a zeaxantin. Lutein a zeaxanthin jsou pro ornamentaci nejvíce využívané karotenoidy u pěvců (McGraw *et al.* 2003) a byly použity i pro experimentální část mé diplomové práce.

1.6.1. Karotenoidy v pohlavním výběru

U živočichů, zvláště u ptáků a ryb jsou karotenoidy součástí jasně červených, oranžových a žlutě zbarvených ornamentů, tvořících sekundární pohlavní znaky uplatňující se při pohlavním výběru (Andersson 1994; Brush & Power 1976; Olson & Owens 1998; Hill 2002). U ptáků je karotenoidní zbarvení součástí peří, zobáků, nohou, hřebenů a kožních laloků (Olson & Owens 2005; Hill 2002). Zejména intenzita zbarvení peří a velikost ornamentu jsou pro samice při výběru partnera důležitými kritérii (Hill 1991; Ellegren *et al.* 1996). Mohou totiž sloužit jako čestné signály a poukazovat na kvality jejich nositelů. Depozice karotenoidů do ornamentů je nákladná a pouze ti nejkvalitnější samci si mohou dovolit ty nejjasnější a nejbarevnější ornamenty (Hill 1996; Hill 2002).

Samice hýla mexického (*Haemorrhous mexicanus*) preferují samce s červenějším zbarveným peřím na hrudi před samci, jejichž peří je žluté (Hill 1991; 1996). Roli v preferenci hrála i velikost této hrudní skvrny, kdy samice upřednostňovaly samce s velkou skvrnou (Hill 1991). Velikost bílé skvrny na čele je také důležitým kritériem pro samice lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*), které na základě velikosti skvrny partnera dokáží ovlivnit poměr pohlaví potomstva (Ellegren *et al.* 1996; Sheldon *et al.* 1997). Velikost skvrny je totiž u lejsků mezi samci a jejich syny dědičná. Pokud tedy samice kopuluje se samcem, jehož skvrna je velká, klade vajíčka, ze kterých se líhne více samčích potomků. Pokud naopak kopulují se samcem s malou skvrnou, líhne se více samiček (Ellegren *et al.* 1996).

Pro samice zebřičky pestré je kritériem kvality samce intenzita zbarvení jeho zobáku, kdy preferováni jsou samci s červenějším zobákem v porovnání se samci, jejichž zobák je spíše oranžový (Blount *et al.* 2003; Simons a Verhulst 2011). Preferencí pro výrazněji zbarvené samce mohou samice získat výhodu dobrých genů pro své potomky, jelikož zbarvení otců a synů, případně velikost ornamentu mohou být dědičné (Hill 1991; Sheldon *et al.* 1997; von Schantz *et al.* 1999). Další výhodou výrazněji zbarvených samců může být nižší míra jejich parazitace, lepší imunitní obrana i delší doba dožití jedince (von Schantz *et al.* 1999; Blount *et al.* 2003; Pike *et al.* 2007). Pérové ornamenty u ptáků slouží jako indikátory dostupnosti

karotenoidů a celkového zdravotního stavu jedince v době jeho přepeřování, kožní ornamenty naopak odráží jejich okamžité množství v potravě (Blount *et al.* 2003).

Různé intenzity karotenoidního zbarvení u jedinců stejného druhu mohou také vypovídat o rozdílných schopnostech jedinců vyhledávat jejich zdroje v přírodě (Olson & Owens 1998). Nákladnost červeného zbarvení samců je navíc v porovnání se žlutým vyšší, jelikož zdroje červených karotenoidů jsou vzácnější (Hill 1996). Odstín ornamentu ale závisí nejen na množství a druhu karotenoidu přijímaného v potravě, ale i dalších genetických, fyziologických a metabolických faktorech (Brush & Power 1976; Hill *et al.* 2002; Pérez-Rodríguez 2009). Velké rozdíly byly nalezeny také ve zbarvení zobáku mezi samci a samicemi zebříček. Samci mají intenzivněji zbarvený zobák než samice, což je způsobeno vyššími hladinami karotenoidů v plazmě (McGraw *et al.* 2003.) U samců jsou sekundární pohlavní znaky ovlivněny ještě množstvím produkovaného testosteronu, kdy jeho hladina u druhů se sezónními svazky prudce stoupá před obdobím rozmnožování. Díky testosteronu je u samců ukládáno do ornamentů více pigmentu a tím se zlepšuje jejich celková kvalita a intenzita (Alonso-Alvarez *et al.* 2008; McGraw *et al.* 2006).

1.6.2. Hypotézy o funkci karotenoidů v kontextu oxidačního stresu

Jak bylo popsáno v kapitole o oxidačním stresu, spermie jsou vysoce metabolicky aktivní, čímž jsou na oxidační poškození velmi náchylné (Tremellen 2008). Někteří samci mohou mít působením oxidačního stresu poškozené spermie s menší motilitou nebo mohou být úplně neplodní. Pro samice tak může být výhodné takového samce na základě jeho ornamentace rozpoznat a vybrat si jiného (Blount *et al.* 2001).

Dlouho byla uvažována a diskutována možná role karotenoidů jako antioxidantů (Brush & Power 1976; Hill *et al.* 2002). V teoretických *in vitro* modelech vzhledem k jejich chemickému potenciálu, dlouhým řetězcům s konjugovanými dvojnými vazbami, mohou fungovat jako antioxidanty. Dokážou zachytit energii (např. ve formě volného kyslíkového radikálu), tuto energii absorbovat, vyžárit ji zpět ve formě tepla, a tak buňku ochránit před oxidačním poškozením (Foote *et al.* 1970; Burton 1989). Tato jejich funkce je podmíněna nižší hladinou parciálního tlaku kyslíku (Burton 1989; Edge & Truscott 1997). Výsledky potvrzující antioxidační funkce karotenoidů *in vivo* studií zůstávají ale smíšené. Zatímco několik studií uvažující nad antioxidačními účinky karotenoidů tuto jejich úlohu zpochybnilo (např. Costantini & Møller 2008; Olson & Owens 1998; Hartley & Kennedy 2004; Simons *et al.* 2012), nová studie Tomášek *et al.* 2016 u zebříček antioxidační funkci karotenoidů v organismu potvrdila. Tento první *in vivo* důkaz se povedlo získat díky nové metodice měření antioxidační kapacity, která může být důvodem, proč ostatní studie dosud tento výsledek nepřinesly.

Existuje také hypotéza, že karotenoidy mohou fungovat jako prooxidanty (Palozza 1998). Karotenoidy totiž díky dvojným vazbám v řetězci mohou být samy náchylné ke štěpení (Packer *et al.* 1981). Při tomto štěpení mohou vznikat různé meziprodukty, např. karotenoidní

radikál, který už nemá žádné barevné vlastnosti a pro organismus je toxický (Edge & Truscott 1997; Siems *et al.* 2005). K tomu by mohlo dojít např. za stresových podmínek, pokud by množství reaktivních kyslíkových částic v buňkách vzrostlo a antioxidační mechanismy by tyto částice nestíhaly vychytávat. Karotenoidy by tak místo antioxidační funkce mohly mít funkci prooxidační (Edge & Truscott 1997; Palozza 1998; Siems *et al.* 2005). Tyto meziprodukty štěpení mohou mít proapoptotické, růstově inhibiční či imunosupresivní účinky. Aby tomuto škodlivému působení bylo zabráněno, musí být tyto meziprodukty vychytávány jinými antioxidanty, jako jsou antioxidační enzymy či vitaminy C a E (Edge & Truscott 1997; Hartley & Kennedy 2004; Siems *et al.* 2005). Vitaminy C a E jakožto pravé antioxidanty škodlivé meziprodukty nevytvářejí, proto může být antioxidační funkce karotenoidů zpochybnitelná (Hartley & Kennedy 2004). Byla proto navržena hypotéza, že samotné karotenoidy neslouží jako antioxidanty, ale indikují přítomnost jiných nebarevných antioxidantů (Hartley & Kennedy 2004). S jinými organismem syntetizovanými či z potravy získanými antioxidanty by také karotenoidy mohly spolupracovat (Sies 1993; von Schantz *et al.* 1999; Liu *et al.* 2004). Intenzivní karotenoidní ornament by tak na základě této hypotézy vykazovali pouze jedinci s nízkou oxidační zátěží a dostatkem jiných antioxidantů (Hartley & Kennedy 2004).

Při dlouhodobém působení oxidačního stresu mohou navíc vysoké dávky karotenoidů a jejich vznikajících toxických produktů znamenat fyziologický handicap (Hartley & Kennedy 2004). Tím se zabývá tzv. carotenoid maintenance hypotéza. Ta předpokládá, že karotenoidy v ornamentaci slouží jako čestný signál, který je udržován rovnováhou mezi pozitivní funkcí karotenoidů a škodlivými účinky jejich produktů. Karotenoidy tak zdravé a kvalitní jedince nijak neohrožují, naopak pro nemocné nebo jinak stresované jedince mohou jejich vyšší hladiny představovat hrozbu (Vinkler & Albrecht 2010). Nemocný jedinec by tak příjem karotenoidů s jejich možnými prooxidačními účinky měl raději minimalizovat. Otázkou, na kterou snad budoucí výzkum nalezne odpověď tedy zůstává, zda karotenoidy v kontextu v úvodu zmíněné redox-based PLFH hypotézy a udržování homeostázy organismu mají prospěšné antioxidační účinky, škodlivé prooxidační účinky díky jejich meziproduktům nebo jsou neutrální a na redoxní homeostázu nemají žádný vliv.

1.7. Modelový druh

Zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*) je malý, 12 až 15 g vážící pták z řádu pěvců (*Passeriformes*), nejpočetnější a nejrozšířenější druh z čeledi astrildovitých (*Estrildinae*). Rozlišujeme dva poddruhy zebříčky lišící se zejména váhou, délkou křídel a délkou zobáku (Clayton *et al.* 1991). Menší *Taeniopygia guttata guttata* z východní oblasti Indonésie byla dovezena do Evropy již počátkem 19. století výpravou Nicolase Baudina. Vědecky popsáni byli ptáci z této výpravy ale roku 1817 taxonem Louis Jean Pierre Vieillotem jako *Fringilla guttata*. Větší poddruh *Taeniopygia guttata castanotis* obývajících kontinentální Austrálii byl popsán později, roku 1837 ornitologem Johnem Gouldem jako *Amadina castanotis*, který

obdržel exemplář z oblasti Nového Jižního Walesu. Zebřičky v Austrálii najdeme až na 75 % území, typickým habitatem jsou otevřené biotopy aridních a semiaridních oblastí s velkými teplotními výkyvy, v období dešťů bohaté na travní porosty. Tyto porosty představují pro výlučně granivorní zebřičky významný zdroj potravy, proto období dešťů také souvisí se zahájením jejich hnízdní sezóny. V Indonésii zebřičky obývají také rýžová pole a druhotně oblasti s řidšími lesními porosty (Zann 1996).

Australský poddruh zebřičky je významným modelovým druhem obratlovce využívaného pro behaviorální, fyziologické a neurologické studie. Má významnou roli ve studiích zabývajících se pohlavním výběrem, spermatogenezí a kompeticí spermií (Griffith *et al.* 2010). K jejich častému využití ve vědě také přispívá to, že mají kompletně osekvenován jejich genom. Do obliby v Evropě přišel poddruh počátkem 70. let 19. století zejména díky jeho nízké prodejní ceně a rychlému a snadnému odchovu v zajetí díky nenáročnosti na prostor a potravu. V zajetí se tento poddruh zebřičky chová již kolem 150 let. Bylo z něj odvozeno mnoho linií, které jsou označovány za domestikované. Existuje ale také „divoká“, recentně domestikovaná linie odvozená od divokých zebřiček, která je v zajetí chovaná pouze několik málo generací, tzv. „recently wild-derived“. Ve své diplomové práci se zabývám oběma těmito liniemi, domestikovanou i „divokou“.

U zebřiček je typický pohlavní dimorfismus ve velikosti, váze a zbarvení peří a zobáku. Samice jsou těžší, samci mají delší zobáky a křídla. Také jsou výrazněji zbarvení než samice, mají červenější zobáky, oranžové skvrny na tvářích, horizontální černobílé pruhy v oblasti hrudi, černé skvrny na prsou a hnědé skvrny na křídlech. Typický fenotyp samce je zobrazen na obrázku č. 3. Zebřičky jsou sociální koloniální ptáci, v době hnízdění tvoří hejna až o velikosti 50 párů. Ačkoliv jsou sociálně monogamní, v přírodních populacích dochází k vysoké mortalitě, a tak tvorbě nových párů (Zann 1996). Také může docházet k extrapárovým kopulacím a extrapárovým paternitám (Birkhead *et al.* 1990). Obecně tento jev u sociálně monogamních druhů významně ovlivňuje reprodukční úspěch mezi samci v rámci populace, nicméně u divokých populací zebřiček dochází k extrapárovým kopulacím spíše vzácně (Whittingham & Dunn 2005). Studie 82 potomků pocházejících z celkem 25 snůšek našla pouze 2 mláděta s extrapárovou paternitou, tj. 2,4 % mládět (Birkhead *et al.* 1990). Také novější studie 299 mládět pocházejících z 80 snůšek objevila pouze 5 mládět s extrapárovou paternitou, tj. pouze 1,7 % mládět (Griffith *et al.* 2010). Naopak u domestikovaných populací může k extrapárovým kopulacím docházet častěji. Studie 71 mládět z 18 snůšek našla 4 mláděta s extrapárovou paternitou, tj. 5,6 % mládět a další studie 278 potomků pocházejících z celkem 126 snůšek našla 74 mládět s extrapárovou paternitou, tj. 28 % (Birkhead *et al.* 1989; Burley *et al.* 1996). Tak výrazný rozdíl v míře extrapárových paternit mezi domestikovanými a divokými

populacemi zebříček může být způsoben sociálními či environmentálními faktory nebo samotnou domestikací trvající už více než 100 generací (Griffith *et al.* 2010).

U zebříček také může docházet k vnitrodruhovému hnízdnímu parazitismu. Při výzkumu 92 mládřat pocházejících z celkem 25 snůšek 10 mládřat v 9 snůškách bylo parazitických, tj. 10,9 % všech mládřat a parazitováno bylo 36 % snůšek. Vnitrodruhový parazitismus může být prostředkem obrany proti predaci celé snůšky, ale je velmi těžké jej studovat, protože je málokdy přímo pozorován (Birkhead *et al.* 1990). Divoké populace zebříček se rozmnožují v průběhu celého roku v závislosti na množství srážek a dostupnosti potravy. Typická velikost snůšky čítá 5 vajíček, menší snůšky jsou obvyklé ke konci hnízdní sezóny. Snůšku inkubují obě pohlaví v rozmezí 11-15 dní a průměrný věk rodičů v době první snůšky je 95 dní u samců a 92 dní u samic. Rodiče se o mládřata v hnízdě starají a krmí je do věku 17-18 dní. Poté mládřata hnízdo opouští, osamostatňují se, ale jsou další 2 týdny ještě příkrmována rodiči. V zajetí tak mohou úspěšné páry zahnízdit i pětkrát za rok (Zann 1996).



Obrázek č. 3: Samec zebříčky pestré.

2. Cíle práce

Cílem této práce je zjistit, jaký vliv má oxidační stres a karotenoidy na spermatogenezi u zebřiček pestrých.

Díličními otázkami jsou:

- 1) Má oxidační stres, karotenoidy a jejich interakce vliv na spermatogenezi u domestikovaných a divokých populací mnou testovaných samců zebřiček pestrých?
- 2) Existuje vztah mezi histologickými parametry (morfometrická analýza varlat) a podílem abnormálních spermií v ejakulátu?
- 3) Ovlivňuje oxidační stres, karotenoidy a jejich interakce intenzitu signálu acetylovaného α - tubulinu a souvisí tato intenzita s rychlostí pohybu spermií?
- 4) Ovlivňují karotenoidy pozitivně spermatogenezi a je relevantní antioxidační, prooxidační či neutrální hypotéza?

3. Metodika

3.1. Modelový druh a chov

Experiment probíhal ve dvou letech na samcích zebřičky pestré. Samci byli staří 1 až 1,5 roku a byli chováni ve vnitřních chovech Ústavu biologie obratlovců AV ČR, detašované pracoviště Studenec. Experiment probíhal od července do srpna roku 2011 na zebřičkách chovaných již po mnoho generací v zajetí-domestikovaných („domesticated“). Poté byl experiment zopakován na populaci blízké divokým zebřičkám („recently wild-derived“), který trval od července do srpna roku 2012.

Samci byli chováni individuálně v klecích o rozměrech 60x40x40 cm a krmení semeny prosa, sěpiovou kostí, skořápkovou drtí a vodou. 4 týdny před začátkem experimentu byla semena prosa nahrazena loupánými semeny prosa, které bylo během experimentu použito k nízké suplementaci karotenoidy. Během dubna a května navíc došlo k navození hnízdních podmínek změnou fotoperiody z 10 : 14 hodin (den : noc) na 14 : 10 hodin (den : noc) a umístěním 8 samic v samostatných klecích do těsné blízkosti samců, umožňujících jim vzájemný vizuální i hlasový kontakt.

3.2. Experimentální design

Během experimentu byl v obou letech sledován vliv oxidačního stresu a karotenoidů na morfologii a motilitu spermií a podíl abnormálních spermií v ejakulátu. Na vzorcích z roku 2011 byly navíc sledovány změny v detekci acetylovaného α -tubulinu spermií a provedena histologie varlat zebřiček. Samci byli náhodně rozděleni do 4 skupin. V roce 2011 bylo použito 60 samců (N=4x15), v roce 2012 bylo použito 80 samců (N=4x20). Po dobu experimentu (10 týdnů) byla ovlivňována hladina oxidačního stresu a dávka přijímaných karotenoidů v 2x2 faktoriálním designu. Každá skupina (treatment) dostávala jednu ze čtyř následujících kombinací: 1. nízká hladina oxidačního stresu i karotenoidů (=kontrola, ROS-, CAR-), 2. nízká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS-, CAR+), 3. vysoká hladina oxidačního stresu + nízká dávka karotenoidů (ROS+, CAR-), 4. vysoká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS+, CAR+).

Hladina oxidačního stresu byla u treatmentu ROS+ zvyšována podáním diquat dibromidu (Reglone 200 g/l, Syngenta, UK), látkou zvyšující hladinu volných kyslíkových radikálů *in vivo*. Pro navození podmínek oxidační zátěže byl diquat zebřičkám podáván rozpuštěný v pitné vodě v subletální dávce 25 mg/l, která neměla žádné dlouhodobé vedlejší účinky na kondici ptáka (Tomášek *et al.* 2016). Skupina ROS- dostávala pouze pitnou vodu. Vysoká dávka karotenoidů u skupiny CAR+ byla přijímána s potravou. 200 mg luteinu a zeaxanthinu (1 ml FloraGLO Lutein 20 % SAF, Kemin/DSM, France) a 1 ml světlicového oleje (Jules Brochenin, France) bylo přimícháno k 1 kg semen loupáného prosa (pro zjednodušení a lepší přehlednost dále uvádím v části Výsledky a Diskuze pouze lutein). Tato

koncentrace karotenoidů se blíží maximálnímu množství, které jsou zebřičky ještě schopny asimilovat (Alonso-Alvarez *et al.* 2004a), byla proto zvolena jako vhodná k ověření hypotézy o možném pro-oxidačním účinku karotenoidů. Ptáci jsou schopni asimilovat 100 až 200 mg/g karotenoidů z potravy a pěvci ve volné přírodě běžně přijímají v potravě přes 100 mg/g karotenoidů (Hill *et al.* 2002), proto zvolené experimentální dávce mohou být vystaveni i v přírodě volně žijící ptáci. Skupina CAR- dostávala 1 kg semen loupavého prosa smíchaného s 2 ml světlicového oleje a 10 mg α -tocopherolu (Sigma-Aldrich). Obě připravené karotenoidové diety byly do doby použití zmrazeny na -80 °C, aby se zabránilo degradaci karotenoidů. Vzorky ejakulátu byly odebrány před začátkem a na konci experimentu, varlata byla vyjmuta po konci experimentu. Všechna experimentální měření byla provedena naslepo, tzn. známy byly pouze identifikační čísla samců bez znalosti skupiny, do které samec patřil.

Vzhledem k načasování experimentu již do léta roku 2011 a mému nástupu do bakalářského studia na Přírodovědeckou fakultu od října 2011 jsem se do experimentu zapojila až během roku 2015. Mým úkolem bylo na vzorcích z roku 2012 zopakovat měření morfometrie spermií, analyzovat nahrávky motility spermií a podíl abnormálních spermií v ejakulátu, která byla provedená v roce 2011. Současně jsem na vzorcích z roku 2011 měla dodělat analýzu acetylace α -tubulinu a morfometrickou analýzu varlat. Vzhledem k nutné přesnosti měření morfometrie spermií jsem na vzorku 20 samců testovala opakovatelnost mého měření v porovnání s daty naměřenými v roce 2011 Mgr. Pavlínou Opatovou, Ph.D. Celková opakovatelnost mého měření byla 100 % (opakovatelnost měření hlavičky 95 %, opakovatelnost měření střední a hlavní části bičíku 100 %, celkem bylo analyzováno 20 spermií od jednoho samce).

3.3. Odběr vzorků a měření motility spermií

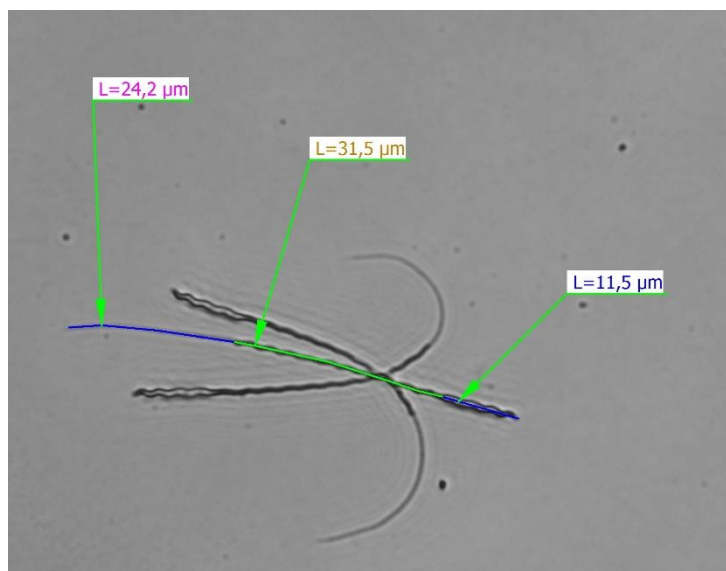
Vzorky ejakulátu (přibližně 0,5 – 3 μ l) byly odebrány neinvazivní metodou jemné kloakální masáže (Wolfson 1952) pomocí skleněné mikrokapiláry o objemu 5 μ l a ihned rozpuštěny v 60 μ l média DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, USA). Přibližně 3 μ l naředěného vzorku bylo ihned použito k analýze motility spermií, zbytek vzorku na analýzu morfometrie spermií, podílu abnormálních spermií v ejakulátu a acetylaci α -tubulinu byl uchován v 1,5 ml Eppendorf zkumavkách s 200 μ l 10 % roztoku formalínu. Na analýzu motility spermií byl ejakulát ihned po naředění umístěn na předeřhátá Leja podložní sklíčka (Leja, The Netherlands) na vyhřevnou desku a motilita spermií byla natáčena světelným mikroskopem (Olympus CX41) s fázovým kontrastem a digitální kamerou (digital UI-1540-C, Imaging Development Systems, Germany).

Natáčení motility spermií probíhalo za konstantní teploty 40 °C a zvětšení 100x. Nahrávání bylo nastaveno na kvalitu 50 Hz a počet snímků 25, spermie tak byly natáčeny 0,5 vteřiny. Nahrávky byly později analyzovány pomocí programu CASA, software CEROS

(computer-assisted sperm analysis system, Hamilton Thorne, USA). U každého samce byly měřeny 3 hodnoty o rychlosti pohybu spermií: VCL („velocity curvilinear“, [$\mu\text{m.s}^{-1}$]), vyjadřující rychlost na celkové trajektorii složené ze všech bodů, kterými se spermie pohybovala, VSL („velocity straight-line“, [$\mu\text{m.s}^{-1}$]), která vyjadřuje rychlost spočítanou na přímé trajektorii od počátečního do nejvzdálenějšího bodu, do kterého se spermie v daném časovém úseku dostala a VAP („velocity average path“, [$\mu\text{m.s}^{-1}$]), vyjadřující rychlost po upravené a mírně vyrovnané trajektorii. Údaje byly měřeny pro 50 spermií u každého samce. Pro následnou analýzu dat byla vzhledem k vysoké vzájemné korelaci použita pouze hodnota VCL, která motilitu spermií bez přítomnosti vajíčka vystihuje nejlépe (Kleven *et al.* 2009).

3.4. Morfometrie spermií

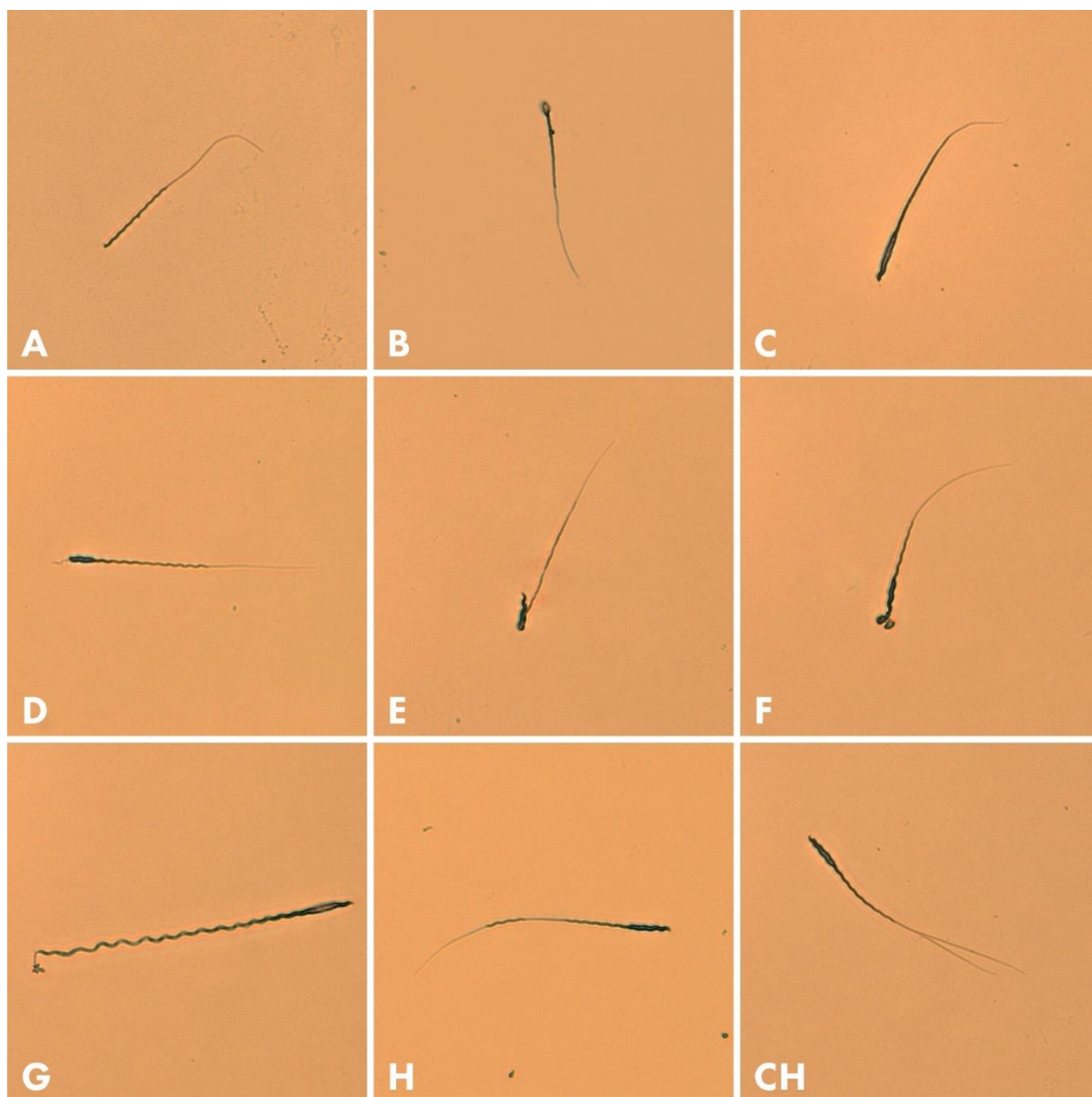
Z ejakulátu uchovaného v 1,5 ml Eppendorf zkumavkách s 10 % roztokem formalínu byly dále připraveny mikroskopické preparáty na analýzu morfometrie a abnormalit spermií. 7 μl roztoku formalínu se spermiemi bylo resuspendováno a pipetou nanášeno na podložní sklíčko, rozetřeno a sklíčko byla ponechána k zaschnutí. Poté byla opláchnuta destilovanou vodou, čímž došlo k odstranění krystalků formalínu a lepší viditelnosti spermií. Sklíčko byla poté fotografována na světelném mikroskopu (Olympus BX51) s digitální kamerou (DP72, OLYMPUS) při zvětšení 200x. Pro každého jedince bylo nafoceno a analyzováno 15 morfologicky intaktních spermií, měřena byla délka hlavičky, střední a hlavní části bičíku. Ukázka měření morfometrie spermie je zobrazena na obrázku č. 4. Celková délka spermií (TSL, total sperm length) pak byla spočítána součtem těchto tří komponent. Morfometrie spermií byla měřena pomocí programu ImageJ 1.51i.



Obrázek č. 4: Ukázka měření 3 komponent spermií: (směr zprava doleva): hlavička, střední část bičíku s mitochondriální pochvou a hlavní část bičíku v programu ImageJ 1.51i.

3.5. Analýza abnormalit spermií

Pro každého jedince bylo za použití světelného mikroskopu (Olympus BX51) při zvětšení 400x hodnoceno 100 náhodně vybraných spermií. Jako abnormalní byly hodnoceny spermie morfologicky odlišné od spermií s normálním spirálovitým tvarem hlavičky, s různými deformitami, s poškozenou střední částí či abnormalní morfologií hlavní části bičíku. Příklady abnormalit jsou zobrazeny na obrázku č. 5.



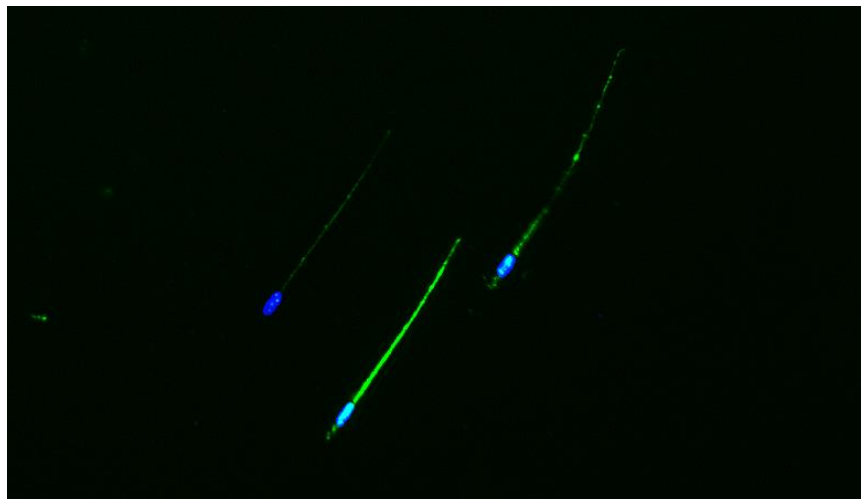
Obrázek č. 5: Příklady abnormalit spermií: A) spermie bez hlavičky, B) spermie s malou kulatou hlavičkou C) spermie s velkou hlavičkou, D) spermie s abnormalním akrozomem, E) spermie s otočenou hlavičkou, F) spermie s cytoplazmatickou kapkou („cytoplasmic droplet“) na hlavičce, G) spermie s abnormálně dlouhou mitochondriální pochvou podél celého bičíku, H) spermie s přerušenou mitochondriální pochvou, CH) spermie s dvojitou hlavní částí bičíku.

3.6. Analýza acetylace α -tubulinu

Na ejakulátu uchovaném v 1,5 ml Eppendorf zkumavkách s 10 % roztokem formalínu byla dále testována intenzita signálu acetylovaného α -tubulinu. Vzorky byly kvůli důkladnému promytí od formalínu celkem 3 dny promývány roztokem PBS (phosphate buffered saline, fosfátový pufr s pH 7,4). Zkumavky byly nejprve 5 minut centrifugovány (MiniSpin, Eppendorf) při 2500 otáčkách (2,5 rpm). Supernatant formalínu byl opatrně odsát pipetou a k peletě spermií bylo přidáno 150 μ l PBS. Tento postup byl 3x zopakován. Třetí den byly vzorky centrifugovány, supernatant odsát a k peletě spermií bylo přidáno 100 μ l 0,1 % Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) v PBS na 15 minut. Jedná se o neiontový detergent, který permeabilizuje plazmatické membrány buněk. Zkumavky byly poté opět centrifugovány, supernatant odsát a k peletě spermií přidáno 300 μ l PBS na promytí od Tritonu. Vzorky byly centrifugovány, supernatant odsát a k peletě přidáno 100 μ l 5 % roztoku BSA (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) ředěného v PBS. Pro detekci určitého proteinu pomocí specifické protilátky je nutné nejprve plazmatickou membránu tzv. zablokovat, jelikož má schopnost nespecificky vázat všechny proteiny. BSA slouží právě jako blokační činidlo proteinových vazebných míst. Po 60 minutách byly vzorky centrifugovány, supernatant odsát a k peletě přidáno 100 μ l primární protilátky proti acetylovanému α -tubulinu (koncentrace 1:200 v PBS, Mouse IgG, Sigma-Aldrich).

Vzorky byly takto barveny přes noc, druhý den centrifugovány, supernatant odsát a peleta 2x promyta 200 μ l PBS. Po odsátí PBS byla k peletě spermií přidána sekundární protilátka (koncentrace 1:300 v PBS, Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488, Invitrogen). Po 60 minutách barvení byly vzorky centrifugovány, supernatant odsát, přidáno 200 μ l PBS a peleta opatrně resuspendována pipetou. Vzorky byly poté centrifugovány, supernatant odsát a k peletě přidáno 50 μ l barviva DAPI (koncentrace 1:1000 v PBS, Thermo-Scientific) k obarvení jader spermií. Po 10 minutách barvení bylo do zkumavek přidáno 200 μ l PBS, vzorky centrifugovány, supernatant odsát. K peletě bylo kvůli důkladnému promytí ještě jednou přidáno 200 μ l PBS, vzorky centrifugovány a většina supernatantu odsáta. Zhruba 20 μ l bylo ve zkumavkách ponecháno, peleta resuspendována a každý vzorek byl odsát do jedné z jamek speciální 96 jamkové destičky (96 well glass bottom plate, Cellvis). Destička byla poté umístěna pod ImageXpress Micro XLS mikroskop (Molecular Devices) a každá z jamek byla samostatně nafocena při zvětšení 200x. Z každé jamky byly foceny 4x4 body ve čtvercovém rozmístění, celkem tedy bylo pořízeno 16 fotografií z jedné jamky. Fotografie byly poté hodnoceny v programu ImageJ 1.51i. Pro každého samce bylo hodnoceno 200 náhodně vybraných spermií. Hodnotila se intenzita značení acetylovaného α -tubulinu ve střední a hlavní části bičíku spermií. Signál byl hodnocen č. 1 jako slabý, č. 2 jako střední a číslem 3 jako silný. Ve střední a hlavní části bičíku spermií byl ještě rozlišován signál jako rovnoměrný, pokud byl viditelný podél celé

jejich délky, anebo jako přerušovaný (v tzv. clusterech), pokud střední a hlavní část bičíku nebyly po celé délce rovnoměrně značeny. U hlavičky spermií bylo rozlišováno, zda měly či neměly značený akrozom. Ukázka spermií s různou intenzitou signálu acetylovaného α -tubulinu je zobrazena na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6: Fluorescenčně značené spermie. Modře značené jádro hlavičky (DAPI), zeleně acetylovaný α -tubulin. Vlevo: spermie s rovnoměrně značeným bičíkem s nejnižší intenzitou signálu bez značeného akrozomu. Uprostřed: spermie s rovnoměrně značeným bičíkem s nejvyšší intenzitou signálu a značeným akrozomem. Vpravo: spermie s přerušovaně značeným bičíkem (signál v „clusterech“) se střední intenzitou signálu a značeným akrozomem.

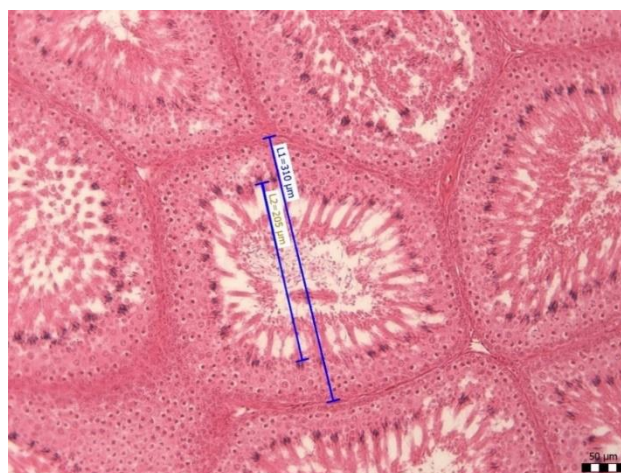
3.7. Příprava histologických preparátů a morfometrická analýza

Po skončení experimentu byli samci zebříček usmrceni a při pitvě jim byla odebrána varlata. Pro morfometrickou analýzu bylo od každého samce použito vždy větší z varlat. Varlata byla fixována a skladována v roztoku 10 % formalínu v 1,5 ml Eppendorf zkumavkách. Poté byla přendána do 12 ml Eppendorf zkumavek a promývána v 8 ml PBS (pH 7,4). Zkumavky byly umístěny na kyvadlovou třepačku v chladové místnosti s teplotou 4 °C a vždy po 1 hodině bylo PBS vyměněno za nové, celkem byla varlata promývána 6x. Následně byla varlata umístěna do 8 ml 25 % etanolu, kde byla ponechána přes noc. Druhý den ráno byla varlata umístěna do 8 ml 50 % etanolu, ponechána přes noc a třetí den umístěna do 8 ml 70 % etanolu, ve kterém byla opět ponechána přes noc. Čtvrtý den byla varlata přendána do histologických kazet, které nadále plavaly v kádince se 70 % etanolem a odneseny do servisní histologické laboratoře Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Zde je servisní pracovník umístil do odvodňovacího procesoru (Leica ASP200S), které probíhá přes noc. Pátý den ráno byly vzorky připraveny na zalévání do parafinu (Histovax). Na každý vzorek byla postupně připravena samostatná kovová vanička. Na dno každé vaničky byla nalita tenká vrstva parafinu, varlata pomocí nahříváné pinzety vyndána z histologických kazet a opatrně umístěna na tuhnoucí parafínovou vrstvu. Poté byly vaničky zcela naplněny parafinem, aby byla varlata

zcela zalita. Vaničky byly 1,5 hodiny ponechány na chlazené ploše k zatuhnutí. Poté byly parafínové bločky z kovových vaniček vyjmuty a bločky do dalšího zpracování skladovány v lednici.

Parafínové bločky byly dále nařezány na mikrotomu (Leica RM2255) na řezy o tloušťce 7 μm . Řezy byly na 15 minut umístěny do vodní lázně vyhřívané na 39 °C (Dixell WB1) a poté přeneseny na adhezni podložní sklíčka (Menzel Gläser, SuperFrost Plus, Thermo Scientific). Sklíčka byla dále 1 hodinu ponechána na vyhřívané desce k uschnutí (Purpath DR001) při 42 °C. Pro následnou histologickou analýzu musely být řezy odparafínovány pomocí roztoku Diasolv (Dia-Path) po dobu 3x5 minut a zavodněny sestupnou etanolovou řadou (100 %, 90 %, 70 % etanol, každý po dobu 5 minut). Na závěr byly řezy 10 minut ponechány v destilované vodě.

Následně byly řezy barveny pomocí roztoku Mayerův Haematoxin (Dia-Path) po dobu 40 vteřin pro obarvení buněčných jader. Poté byly řezy 5 minut promývány destilovanou vodou a po dobu 5 vteřin barveny 0,5 % Eosinem Goy (Dia-Path). Dále byly řezy opět promyty destilovanou vodou a propláchnuty vzestupnou etanolovou řadou (70 %, 80 %, 90 %, 96 % etanol), čímž došlo k odvodnění řezů. Poté byly řezy ponechány 5 minut ve 100 % etanolu a po dobu 2x3 minuty projasněny roztokem Diasolvu. Následovalo zalití do montovacího média (Vectashield mounting medium, Vector) a zakrytí krycím sklíčkem. Sklíčka byla poté focena světelným mikroskopem (Olympus CKX 41) s digitální kamerou (Promicam 3-3CC, Promicra) při zvětšení 200x. Morfometrická analýza testikulární tkáně byla hodnocena pomocí programu Quick photo micro 3.1 (Promicra). Bylo hodnoceno celkem 50 semenotvorných kanálků od každého samce. Byl měřen nejmenší průměr semenotvorného kanálku a šířka jeho lumen. Odečtením hodnoty lumen od průměru semenotvorného kanálku byla získána hodnota o výšce semenotvorného epitelu. Ukázka měření semenotvorného kanálku je zobrazena na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7: Morfometrická analýza-ukázka měření průměru semenotvorného kanálku (měřítka vpravo) a šířky jeho lumen (měřítka vlevo) v programu Quick photo micro 3.1.

3.8. Statistické metody

Datový soubor je rozdělen na 2 roky: 2011 a 2012. Rok 2011 obsahuje data o morfometrii a abnormalitách spermií (8 funkčních vlastností, pro každý naměřeny hodnoty před experimentem), morfometrickou analýzu varlat (2 funkční vlastnosti) a intenzitu signálu acetylovaného α -tubulinu (3 funkční vlastnosti), pro každý naměřeny hodnoty před experimentem). Rok 2012 obsahuje pouze morfometrii a abnormality spermií (8 funkčních vlastností, pro každý naměřeny hodnoty před experimentem). Korelace mezi funkčními vlastnostmi pro rok 2011 byla provedena na 23 jedincích, protože pouze na tomto množství byla naměřena data pro všechny funkční vlastnosti. Korelace mezi funkčními vlastnostmi pro rok 2012 byla provedena na 55 jedincích. Korelační matice byly vytvořeny pomocí Corrplot balíčku (Wei & Simko 2016) v programu R (verze 3.4.1). Z dalších analýz byly vyřazeny proměnné VAP (velocity average path) a VSL (velocity straight line), protože byly výrazně korelovány s proměnnou VCL (velocity curvilinear) ($r=0.99$, $r=0.97$). U acetylovaného α -tubulinu byly původně naměřeny 3 intenzity signálu, ale protože nejvyšší intenzita signálu (signál č. 3) byla naměřena na velmi malém počtu spermií, a tedy neměla normální rozdělení, bylo nutné ji sloučit se signálem středním (signál č. 2). Součet Signálu 1 a signálu 2 je vzhledem k metodologii sběru dat vždy roven 200, proto je ve statistických analýzách počítáno pouze se signálem 1. Totéž platí pro rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku a přerušovaný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku („clustery“). Všechny testy kromě morfometrické analýzy varlat byly provedeny pomocí lineárních modelů.

V případě testování vlivu ošetření na naměřené funkční vlastnosti byly jako závislá proměnná použity naměřené funkční vlastnosti a jako nezávislá proměnná typ ošetření. Typ ošetření byl v tomto případě kódován čísly 0 a 1, kde 0 znamená nepřítomnost ošetření diquatem nebo luteinem, 1 znamená ošetření diquatem nebo luteinem. Při testování závislosti výskytu abnormalit spermií na morfometrii varlat byla použita jako závislá proměnná podíl abnormálních spermií a nezávislá proměnná výška semenotvorného epitelu, průměr semenotvorných kanálků a jejich interakce. V případě testování vlivu signálu na VCL (velocity curvilinear) spermií byla jako závislá proměnná použit signál a jako nezávislá proměnná VCL. Všechny proměnné měly normální rozdělení kromě Rovnoměrný ac- α -tu signál (spermie vykazující rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu podél bičíku po proběhnutí experimentu), který byl logaritmován. U všech testů byly použity hodnoty naměřené před experimentem jako kovariáta.

Příklad modelu:

lm (závislá proměnná ~hodnoty naměřené před experimentem+diquat+lutein+diquat:lutein)

Morfometrie varlat byla testována pomocí hierarchické anovy, kde ID samce bylo použito jako error. Jako test mnohonásobného porovnávání byl použit Dunnett test.

4. Výsledky

4.1. Populace domestikovaných zebříček (rok 2011)

Experiment v roce 2011 probíhal na celkem 60 samcích zebříček pestrých, chovaných již po mnoho generací v zajetí-domestikovaných („domesticated“). Samci byli rozděleni do 4 skupin ($n=4 \times 15$), přičemž každá skupina (treatment) dostávala jednu ze čtyř následujících kombinací: 1. nízká hladina oxidačního stresu + nízká hladina karotenoidů (=kontrola, ROS-, CAR-), 2. nízká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS-, CAR+), 3. vysoká hladina oxidačního stresu + nízká dávka karotenoidů (ROS+, CAR-), 4. vysoká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS+, CAR+). Ve všech analýzách odpovídá vliv diquatu hladině oxidačního stresu a vliv luteinu dávce karotenoidů. Počty jedinců, pro které bylo možné analyzovat data, jejich průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených před a po proběhnutí experimentu jsou v příloze (příloha č. 1 a 2). Korelace mezi všemi funkčními vlastnostmi měřenými pro rok 2011 jsou v příloze (příloha č. 3 a 4).

4.1.1. Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií a varlat

Výsledky analýzy zahrnující vliv diquatu, luteinu a jejich interakce na vlastnosti ejakulátu jsou zobrazeny v tabulkách č. 1. a 2. Rychlost pohybu, délku a podíl abnormálních spermií v ejakulátu se podařilo analyzovat celkem u 54 jedinců. Ani jedna z měřených charakteristik spermií nebyla průkazně ovlivněna typem ošetření (Tabulka č. 1). Průměr semenotvorných kanálků a výška semenotvorného epitelu byla analyzována celkem u 47 jedinců. V případě morfometrie varlat měl na průměr semenotvorných kanálků průkazný vliv diquat ($p < 0.001$, $R = 0.02$), lutein ($p = 0.006$, $R = 0.002$) i jejich interakce ($p = 0.007$, $R = 0.001$). Na výšku epitelu měl průkazný vliv lutein ($p < 0.001$, $R = 0.003$) a interakce diquatu a luteinu ($p = 0.001$, $R = 0.005$) (Tabulka č. 2). Průměr semenotvorných kanálků byl statisticky významně snížený u skupiny ošetřené diquatem a skupiny ošetřené diquatem i luteinem oproti kontrole (Graf č. 1, A1). Celkově nepřítomnost ošetření diquatem měla pozitivní vliv na průměr semenotvorných kanálků. Ošetření diquatem celkově snížilo průměr semenotvorných kanálků, a navíc v kombinaci s ošetřením luteinem snížilo průměr semenotvorných kanálků nejvýrazněji (Graf č. 1, A2). Průměrné hodnoty průměrů semenotvorných kanálků u jednotlivých skupiny byly: diquat 207 μm , lutein 221 μm , diquat s luteinem 194 μm , kontrola 223 μm . Celkem bylo změřeno 50 semenotvorných kanálků od každého jedince. Výška semenotvorného epitelu byla statisticky významně zvýšena u skupiny ošetřené diquatem oproti kontrole (Graf č. 1, B1). Průměrné hodnoty výšky semenotvorného epitelu u jednotlivých skupin byly: diquat 136 μm , lutein 124 μm , diquat s luteinem 122 μm , kontrola 123 μm . Výška semenotvorného epitelu byla vypočítána pro 50 semenotvorných kanálků od každého jedince. V případě interakce ošetření luteinem nemělo na výšku semenotvorného epitelu bez ošetření diquatem vliv, oproti tomu při samostatném ošetření diquatem byla výška epitelu vyšší než při ošetření luteinem i diquatem (Graf č. 1, B2).

Tabulka č. 1: Vliv diquatu, luteinu a jejich interakce na vlastnosti ejakulátu. Testy byly provedeny pomocí lineárních modelů. Hodnoty naměřené před experimentem byly použity jako kovariáta.

		Diquat	Lutein	Diquat:lutein	Reziduální stupně volnosti
VCL	estimate ± s.e.	-2,666 ± 3,707	1,228 ± 3,583	3,689 ± 5,388	49
	t-value	-0,719	0,343	0,685	
	p-value	0,475	0,733	0,497	
Délka střední části bičíku spermie	estimate ± s.e.	-0,719 ± 0,842	-0,415 ± 0,811	-0,163 ± 1,219	49
	t-value	-1,282	-0,511	-0,133	
	p-value	0,206	0,611	0,894	
Délka hlavní části bičíku spermie	estimate ± s.e.	1,769 ± 0,901	0,560 ± 0,871	-0,950 ± 1,305	49
	t-value	1,963	0,643	-0,728	
	p-value	0,055	0,523	0,470	
Celková délka spermie	estimate ± s.e.	0,177 ± 0,767	-0,235 ± 0,737	-0,810 ± 1,101	49
	t-value	0,230	-0,319	-0,736	
	p-value	0,819	0,751	0,465	
Podíl abnormálních spermií	estimate ± s.e.	-0,025 ± 0,032	-0,040 ± 0,030	0,021 ± 0,047	49
	t-value	-0,775	-1,331	0,450	
	p-value	0,442	0,189	0,655	

Vysvětlivky: VCL-velocity curvilinear.

Tabulka č. 2: Vliv ošetření na morfometrii varlat. Test byl proveden pomocí hierarchické anovy s interakcí. Jako error faktor bylo použito ID samce. Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné ($p \leq 0.05$). Rozdíly mezi ošetřeními byly testovány Dunnett testem. Průkazné rozdíly mezi ošetřeními jsou znázorněny v grafech č.1 a 2.

		Diquat	Lutein	Diquat:lutein	Reziduální stupně volnosti
Průměr sem. kanálků	F-value	81.816	7.550	7.319	2345
	p-value	<0.001	0.006	0.007	
Výška sem. epitelu	F-value	0.104	12.991	22.358	2345
	p-value	0.747	<0.001	<0.001	

Vysvětlivky: Průměr sem. kanálků-průměr semenotvorných kanálků, Výška sem. epitelu-výška semenotvorného epitelu.

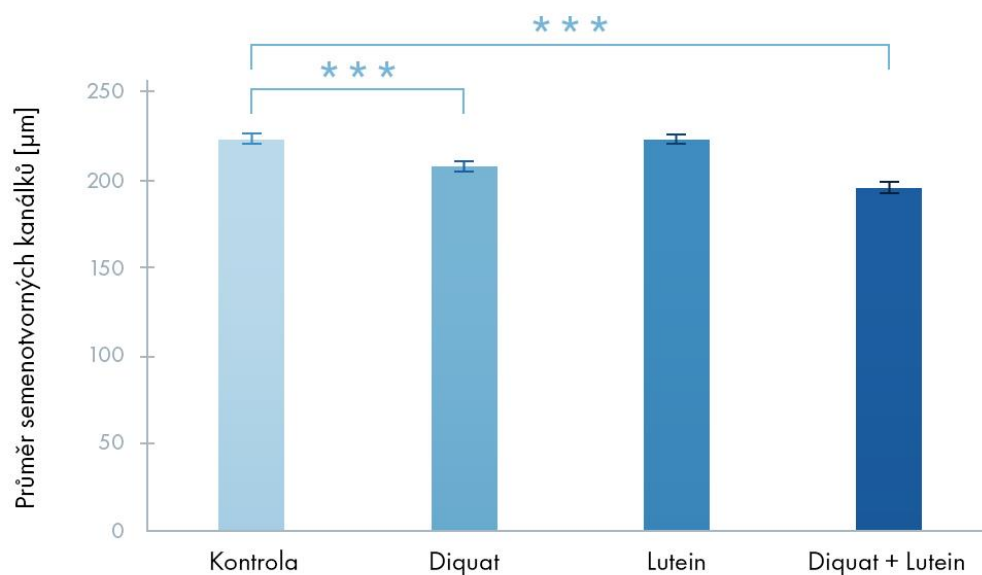
Graf č.1: Vliv ošetření na:

A) průměr semenotvorných kanálků varlat

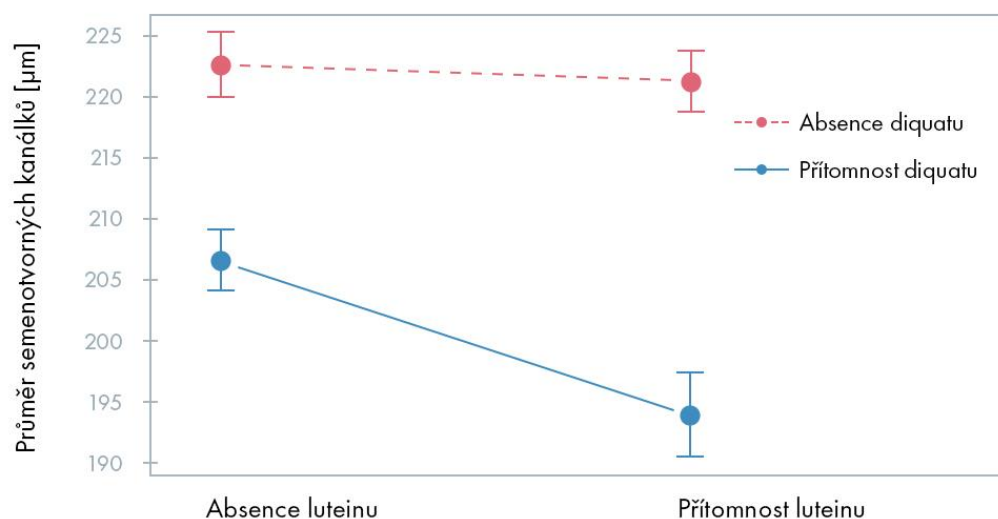
B) výšku semenotvorného epitelu varlat

Sloupce ukazují průměr a chybové úsečky \pm střední chybu průměru. Hvězdičky znázorňují průkazný rozdíl mezi ošetřeními. Statistické analýzy jsou ukázány v tabulce č. 2.

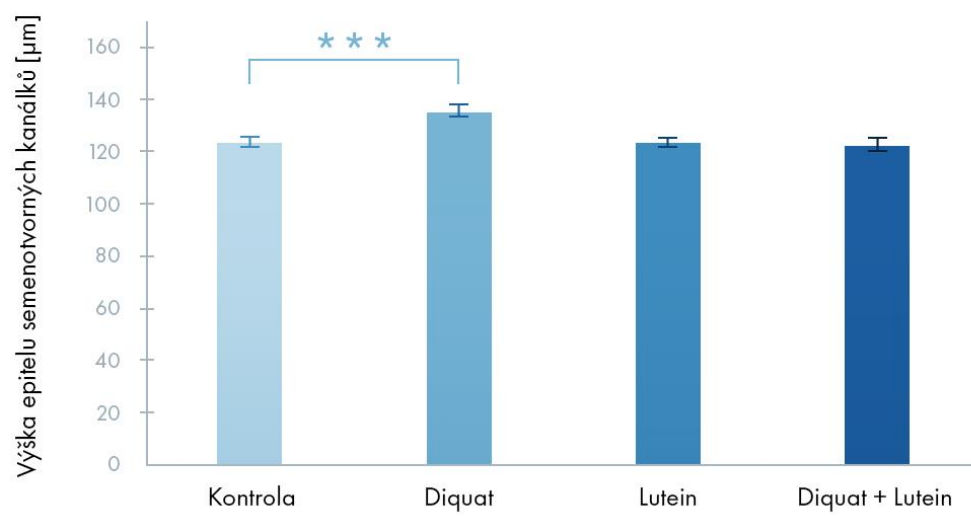
A1)



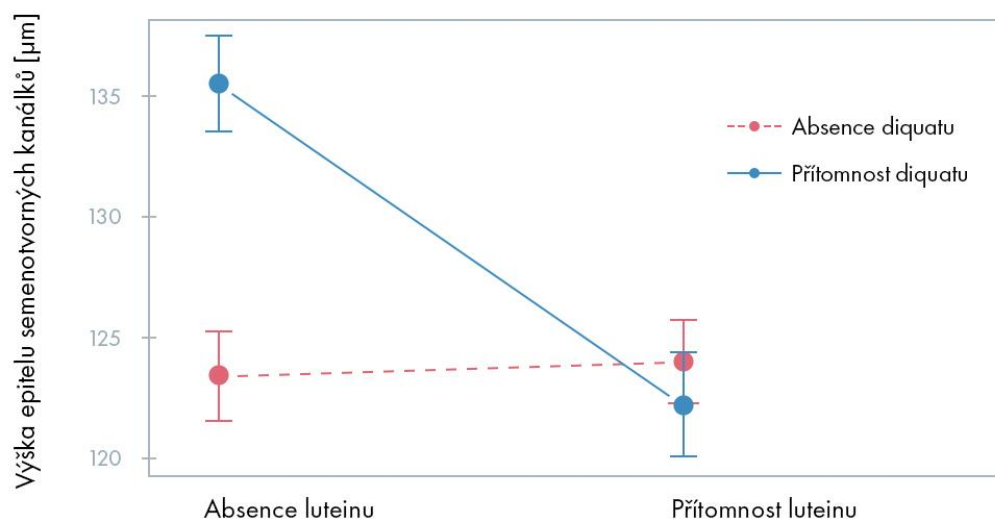
A2)



B1)



B2)



4.1.2 Vliv morfometrie varlat na podíl abnormálních spermií v ejakulátu

Výsledky analýzy vlivu výšky semenotvorného epitelu a průměru semenotvorných kanálků na podíl abnormálních spermií v ejakulátu jsou zobrazeny v tabulce č. 3. Analyzovat se podařilo celkem 45 jedinců. Korelace mezi výškou semenotvorného epitelu a abnormálními spermiemi v ejakulátu byla neprůkazná ($p=0.2$, $r=0.28$). Taktéž korelace mezi průměrem semenotvorných kanálků a abnormálními spermiemi nebyla průkazná ($p=0.5$, $r=0.15$) (Příloha č. 4, 5). Podíl abnormálních spermií v ejakulátu s morfometrií varlat nesouvisel (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Závislost výskytu abnormalit spermií na morfometrii varlat. Test byl proveden pomocí lineárního modelu. Hodnoty naměřené před experimentem byly použity jako kovariáta.

		Epitel	Průměr	Epitel:průměr	Reziduální stupně volnosti
Podíl abnormálních spermií	estimate ± s.e.	-0.003 ± 0.004	-0.002 ± 0.003	0.000 ± 0.000	41
	t-value	-0.688	-0.676	0.731	
	p-value	0.495	0.503	0.469	

Vysvětlivky: Epitel-výška epitelu semenotvorných kanálků, Průměr-průměr semenotvorných kanálků.

4.1.3. Vliv diquat a luteinu na intenzitu a rovnoměrnost signálu acetylovaného α -tubulinu

Výsledky analýzy zahrnující vliv diquat, luteinu a jejich interakce na intenzitu a rovnoměrnost signálu acetylovaného α -tubulinu jsou zobrazeny v tabulce č. 4. Acetylaci α -tubulinu se podařilo analyzovat celkem na 28 jedincích. Na intenzitu signálu acetylovaného α -tubulinu měl průkazný vliv diquat ($p=0.004$, $R=0.02$) a interakce diquat a luteinu ($p=0.002$, $R=0.26$) (Tabulka č. 4). Počet spermií se slabým signálem acetylovaného α -tubulinu podél bičíku byl zvýšený u skupiny ošetřené diquatem oproti kontrole (Graf č. 2, A1). Průměrné hodnoty spermií se slabým signálem u jednotlivých skupin byly: diquat 161, lutein 117, diquat s luteinem 101, kontrola 114. Celkem bylo hodnoceno 200 spermií. V případě interakce ošetření luteinem nemělo na slabý signál bez ošetření diquatem vliv, oproti tomu při samostatném ošetření diquatem byl slabý signál naměřen u více spermií než při ošetření luteinem i diquatem (Graf č. 2, A2). Počet spermií s rovnoměrným signálem acetylovaného α -tubulinu podél bičíku byl zvýšený u skupiny ošetřené diquatem (Graf č. 2, B). Průměrné hodnoty spermií s rovnoměrným signálem u jednotlivých skupin byly: diquat 74, lutein 31, diquat s luteinem 47, kontrola 25. Celkem bylo hodnoceno 200 spermií.

Tabulka č. 4: Vliv ošetření na signál acetylovaného α -tubulinu. Testy byly provedeny pomocí lineárních modelů. Hodnoty naměřené před experimentem byly použity jako kovariáta.

Spermie		Diquat	Lutein	Diquat:lutein	Reziduální stupně volnosti
Slabý ac- α -tu signál	estimate \pm s.e.	43.010 \pm 13.452	4.789 \pm 11.829	-62.969 \pm 18.001	23
	t-value	3.197	0.405	-3.498	
	p-value	0.004	0.689	0.002	
Rovnoměrný ac- α -tu signál	estimate \pm s.e.	0.977 \pm 0.314	-0.003 \pm 0.256	-0.420 \pm 0.380	23
	t-value	3.105	-0.012	-1.108	
	p-value	0.005	0.991	0.279	
Značený akrozom	estimate \pm s.e.	-21.267 \pm 12.358	-6.810 \pm 10.173	26.523 \pm 16.878	23
	t-value	-1.721	-0.669	1.571	
	p-value	0.100	0.511	0.131	

Vysvětlivky: Slabý ac- α -tu signál-spermie se slabým signálem acetylovaného α -tubulinu v bičíku, Rovnoměrný ac- α -tu signál-spermie s rovnoměrným signálem acetylovaného α -tubulinu v bičíku, Značený akrozom-všechny spermie se signálem acetylovaného α -tubulinu v akrozomu.

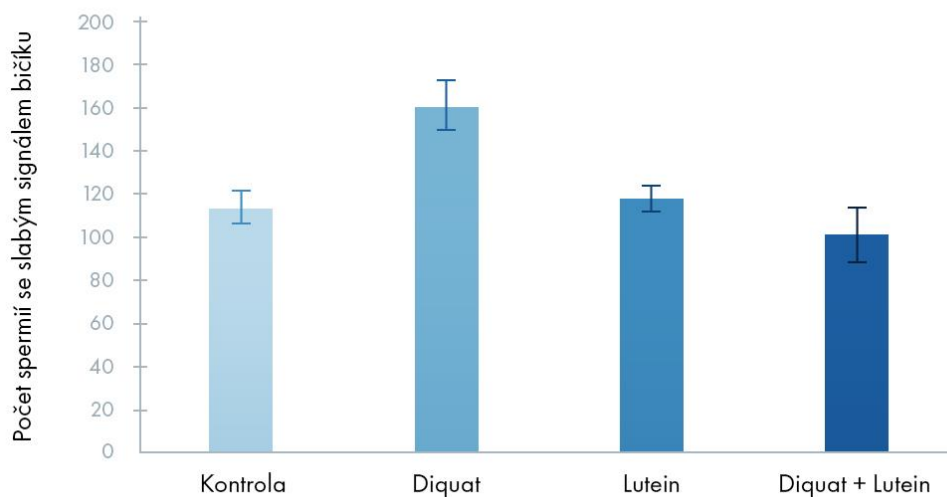
Graf č. 2: Vliv ošetření na:

A) počet spermií vykazujících slabý signál acetylovaného α -tubulinu podél bičíku

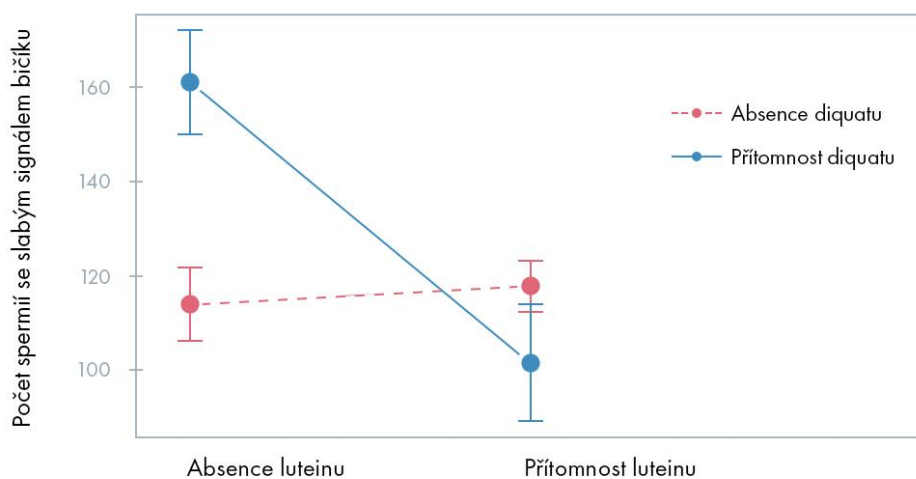
B) počet spermií vykazujících rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu podél bičíku

Sloupce ukazují průměr a chybové úsečky \pm střední chybu průměru. Statistické analýzy jsou ukázány v tabulce č. 3.

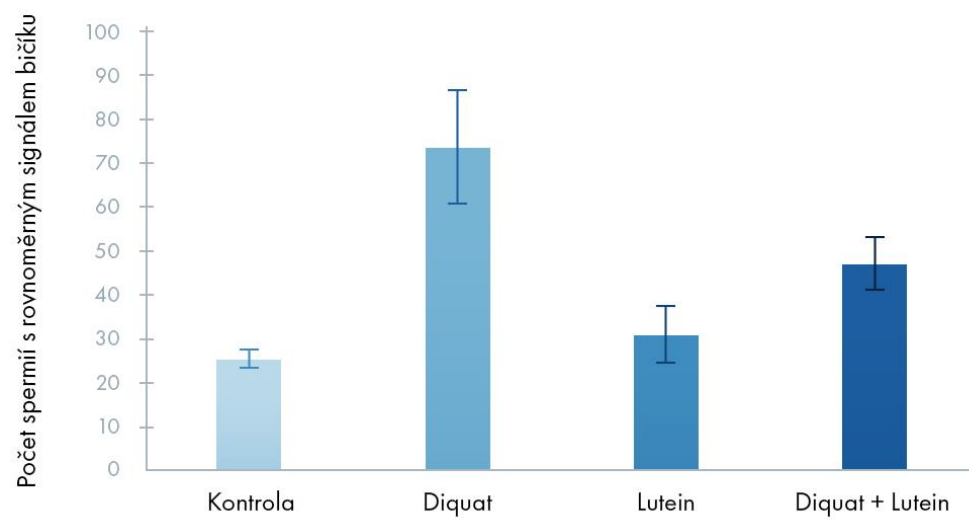
A1)



A2)



B)



4.1.4. Vliv intenzity signálu acetylovaného α -tubulinu na rychlost pohybu spermií

Výsledky analýzy zahrnující vliv intenzity signálu acetylovaného α -tubulinu na rychlost pohybu spermií jsou ukázány v tabulce č. 5. Analyzovat se podařilo celkem 28 jedinců. Korelace mezi VCL a spermiemi se slabým signálem byla neprůkazná ($p=0.26$, $r=-0.24$). Korelace mezi VCL a spermiemi s rovnoměrným signálem také nebyla průkazná ($p=0.92$, $r=-0.02$), stejně tak korelace mezi VCL a spermiemi se značeným akrozomem byla neprůkazná ($p=0.79$, $r=-0.06$) (Příloha č. 4, 5). Intenzita signálu s rychlostí pohybu spermií nesouvisela (Tabulka č. 5).

Tabulka č. 5: Závislost signálu na rychlosti pohybu spermií. Testy byly provedeny pomocí lineárních modelů. Hodnoty naměřené před experimentem byly použity jako kovariáta.

Spermie		VCL	Reziduální stupně volnosti
Slabý ac- α -tu signál	estimate \pm s.e.	-0.547 \pm 0.418	25
	t-value	-1.308	
	p-value	0.203	
Rovnoměrný ac- α -tu signál	estimate \pm s.e.	-0.013 \pm 0.347	25
	t-value	-0.037	
	p-value	0.971	
Značený akrozom	estimate \pm s.e.	-0.118 \pm 0.329	25
	t-value	-0.358	
	p-value	0.723	

Vysvětlivky: Slabý ac- α -tu signál-spermie se slabým signálem acetylovaného α -tubulinu v bičíku, Rovnoměrný ac- α -tu signál-spermie s rovnoměrným signálem acetylovaného α -tubulinu v bičíku, Značený akrozom-všechny spermie se signálem acetylovaného α -tubulinu v akrozomu, VCL-velocity curvilinear.

4.2. Populace blízka divokým zebříčkám (rok 2012)

Experiment v roce 2012 probíhal na celkem 80 samcích zebříček pestrých, na populaci blízke divokým zebříčkám („recently wild-derived“). Samci byli rozděleni do 4 skupin ($n=4 \times 20$), přičemž každá skupina (treatment) dostávala jednu ze čtyř následujících kombinací: 1. nízká hladina oxidačního stresu i karotenoidů (=kontrola, ROS-, CAR-), 2. nízká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS-, CAR+), 3. vysoká hladina oxidačního stresu + nízká dávka karotenoidů (ROS+, CAR-), 4. vysoká hladina oxidačního stresu + vysoká dávka karotenoidů (ROS+, CAR+). Ve všech ukázaných analýzách odpovídá vliv diquatu hladině oxidačního stresu a vliv luteinu dávce karotenoidů. Počty jedinců, od kterých se podařilo získat a analyzovat data, jejich průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených před a po proběhnutí experimentu jsou ukázány v příloze (Příloha č. 6 a 7). Korelace mezi všemi funkčními vlastnostmi měřenými pro rok 2012 jsou ukázány v příloze (Příloha č. 8, 9).

4.2.1. Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií

Výsledky analýzy zahrnující vliv diquatu, luteinu a jejich interakce na vlastnosti ejakulátu jsou zobrazeny v tabulce č. 6. Rychlost pohybu, délku a podíl abnormálních spermií v ejakulátu se podařilo analyzovat celkem u 55 jedinců. Stejně jako v roce 2011 nebyla ani jedna z měřených charakteristik spermií průkazně ovlivněna typem ošetření (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Vliv diquatu, luteinu a jejich interakce na vlastnosti ejakulátu. Testy byly provedeny pomocí lineárních modelů. Hodnoty naměřené před experimentem byly použity jako kovariáta.

		Diquat	Lutein	Diquat:lutein	Reziduální stupně volnosti
VCL	estimate ± s.e.	-1.382 ± 4.568	-3.073 ± 4.096	2.579 ± 6.316	50
	t-value	-0.303	-0.750	0.408	
	p-value	0.764	0.457	0.685	
Délka střední části bičíku spermie	estimate ± s.e.	-0.310 ± 0.571	0.385 ± 0.523	-0.611 ± 0.803	50
	t-value	-0.543	0.735	-0.761	
	p-value	0.590	0.466	0.450	
Délka hlavní části bičíku spermie	estimate ± s.e.	0.351 ± 0.593	-0.584 ± 0.564	1.163 ± 0.827	50
	t-value	0.592	-1.035	1.406	
	p-value	0.556	0.306	0.166	
Celková délka spermie	estimate ± s.e.	0.304 ± 0.490	0.210 ± 0.455	0.151 ± 0.690	50
	t-value	0.621	0.463	0.219	
	p-value	0.537	0.646	0.827	
Podíl abnormálních spermií	estimate ± s.e.	-0.006 ± 0.011	0.002 ± 0.010	0.022 ± 0.015	50
	t-value	-0.587	0.225	1.445	
	p-value	0.560	0.823	0.155	

Vysvětlivky: VCL-velocity curvilinear.

5. Diskuze

5.1. Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky spermií

Zvýšené hladiny oxidačního stresu v organismu mohou pro spermie představovat nezanedbatelné riziko. Oxidační stres je dnes považován za jeden z hlavních faktorů přispívajících k neplodnosti mužů (Iwasaki & Gagnon 1992). Ve své diplomové práci jsem analyzovala vliv diquatu, luteinu a jejich interakce na rychlost pohybu, délku spermií a na výskyt abnormálních spermií v ejakulátu zebřičky pestré. Diquat je běžně používaný herbicid, který v *in vivo* podmínkách produkuje superoxidový radikál, čímž zvyšuje hladinu oxidačního stresu. Jako antagonistu diquatu byl zvolen lutein, jeden z nejvýznamnějších karotenoidů využívaných ptáky pro jejich ornamentaci (McGraw *et al.* 2003). Ukazuje se totiž, že karotenoidy by vzhledem ke svému chemickému potenciálu mohly fungovat jako antioxidanty (Brush & Power 1976; Hill *et al.* 2002).

Produkce volných kyslíkových radikálů byla poprvé zdokumentována na lidských spermiích, u nichž docházelo, při inkubaci za přítomnosti vysokých koncentrací kyslíku k rychlé ztrátě jejich motility (MacLeod 1943). V tomto případě je příčinou snížení motility spermií peroxidace jejich membrán, které tak ztrácejí flexibilitu nutnou k pohybu bičíku (Jones *et al.* 1978). U lidí i dalších savců byl pokles rychlosti a motility spermií při zvýšených hladinách oxidačního stresu demonstrován řadou studií (např. Aitken & Clarkson 1987; De Lamirande & Gagnon 1992; Boujbiha *et al.* 2009). Nicméně se zdá, že u ptáků je vztah oxidačního stresu a motility spermií patrně více komplexní. Výsledky, které jsou součástí této práce, neukázaly pod vlivem působení diquatu, luteinu nebo jejich kombinace žádné změny v rychlosti pohybu spermií u domestikované populace zebřiček, ani u populace blízké divokým zebřičkám. Naproti tomu Tomášek *et al.* (2017) prokázali souvislost mezi rychlostí pohybu spermií zebřiček a mírou počáteční intenzity zbarvení jejich zobáku. Za kontrolních podmínek spermie samců s intenzivněji zbarveným zobákem vykazovaly větší rychlost pohybu, která za podmínek oxidačního stresu klesala (Tomášek *et al.* 2017). Tento výsledek je však v kontrastu se studií provedenou na sýkoře koňadře. V této studii byl zaznamenán pokles rychlosti pohybu spermií za podmínek oxidačního stresu u méně zbarvených jedinců. K největšímu poklesu rychlosti pohybu spermií došlo 5. den experimentu, na konci experimentu (15. den) však nebyly rozdíly v porovnání s kontrolou signifikantní. Samci si tak pravděpodobně během experimentu dokázali vyvinout účinný antioxidační mechanismus (např. zvýšením syntézy antioxidačních enzymů), který negativnímu vlivu oxidačního stresu na rychlost pohybu spermií dokázal zabránit (Helfenstein *et al.* 2010b).

Také u vrabce domácího došlo po podávání diquatu k poklesu rychlosti pohybu spermií, snížená rychlost však byla pozorována pouze u subdominantních samců. U samců ve středu a na vrcholu hierarchického žebříčku k žádnému snížení rychlosti v porovnání s kontrolní

skupinou nedošlo (Mora *et al.* 2017). Výše uvedené informace naznačují, že vliv oxidačního stresu na rychlost pohybu spermií je závislý na více faktorech, popř. může být druhově specifický. Fakt, že sledování faktorů jako postavení samce ve skupině či počáteční zbarvení zobáku studovaných ptáků nebylo součástí této práce, může vysvětlovat, proč se nám oproti našim očekáváním nepodařilo prokázat vliv oxidačního stresu na rychlost pohybu spermií.

Bylo prokázáno, že působením oxidačního stresu může v ejakulátu stoupat množství spermií s abnormální morfologií. Příkladem může být studie provedená na potkanech, u kterých došlo vlivem oxidačního stresu k silnému poškození spermií a normální morfologii vykazovalo pouze 16 % buněk, přičemž nejvíce postiženou částí byl bičík (Tajaddini *et al.* 2013). Naproti tomu u lidí docházelo působením volných kyslíkových radikálů k abnormalitám ve tvaru hlaviček spermie a k poškození akrozomu (Aziz *et al.* 2004). U spermií zebřiček oxidační stres také zapříčinil snížení poměru mezi délkou střední části bičíku a celkovou délkou bičíku (tzn. poměr mezi střední částí bičíku a flagellem), na celkovou délku spermie nebo podíl abnormálních spermií v ejakulátu ale žádný vliv neměl (Tomášek *et al.* 2017). Oproti tomu se v mé práci žádný efekt diquat, luteinu a jejich interakce na morfologii a podíl abnormálních spermií v ejakulátu ani u domestikované, ani u populace blízké divokým zebřičkám prokázat nepodařilo. To zřejmě stejně jako ve výše uvedeném případě může být vlivem dalších nám neznámých faktorů. Možným vysvětlením mohou být rozdíly v odpovědi na působení oxidačního stresu u jednotlivých druhů. Nicméně, tento jev ještě nebyl příliš dobře popsán a studií, které se vlivem oxidačního stresu na morfologii spermií zabývají není mnoho.

Pozitivní vliv na motilitu a procento spermií s fyziologickou morfologií v ejakulátu může mít podávání různých antioxidantů. Ačkoliv v mé práci podávání karotenoidů žádné rozdíly v rychlosti pohybu spermií a podílu abnormálních spermií nezpůsobilo, některé studie je našly. Např. u potkanů při zvýšeném oxidačním stresu se současným podáváním antioxidantu chloridu manganatého došlo k nárůstu počtu spermií vykazujících normální morfologii až na 86 % (Tajaddini *et al.* 20013). U samců koňader při zvýšeném oxidačním stresu karotenoidy zvýšily podíl motilních spermií v ejakulátu (Helfenstein *et al.* 2010b) a u samců zebřiček, kteří měli před experimentem v ejakulátu zvýšený podíl abnormálních spermií, karotenoidy tento podíl snížily (Tomášek *et al.* 2017). Karotenoidy by tak mohly působit jako sekundární antioxidanty, pouze při vystavení organismu akutnímu oxidačnímu stresu (Costantini & Møller 2008). Jelikož v malých množstvích mohou být karotenoidy nalezeny přímo v ejakulátu ptáků (Rowe & McGraw 2008), nelze vyloučit ani přímou antioxidační obranu spermií.

5.2. Vliv diquatu a luteinu na vybrané morfologické znaky varlat

V dřívějších studiích bylo také prokázáno, že zvýšená hladina oxidačního stresu může jak u savců, tak u ptáků způsobit nejen poškození spermií, ale také narušit strukturu tkáně varlat (např. Sajjadian *et al.* 2014; Liu *et al.* 2013). Vlivem oxidačního stresu dochází ke snížení počtu diferenciováných zárodečných i Sertoliho buněk v semenotvorných kanálcích, k celkovému narušení jejich organizační struktury, masivní apoptóze zárodečných buněk a výskytu nekrotické tkáně (Sajjadian *et al.* 2014; Dkhil *et al.* 2016). Dále mohou v semenotvorném epitelu vlivem oxidačního stresu vznikat četné vakuoly (Tokumoto *et al.* 2013; Sajjadian *et al.* 2014). Důsledkem těchto patologických změn může být částečné zastavení spermatogeneze a úplná absence spermií v lumen některých semenotvorných kanálků (Liu *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2017).

Vliv oxidačního stresu na vybrané morfologické znaky varlat byl prokázán i v rámci mojí studie prováděné na zebříčkách. Podávání diquatu u samců způsobilo statisticky významný nárůst výšky epitelu v jejich semenotvorných kanálcích. Výška semenotvorného epitelu činila průměrně 123 μm u kontroly, 135 μm u skupiny ovlivněné diquatem, 124 μm u skupiny ovlivněné luteinem a 122 μm u skupiny ovlivněné diquatem s luteinem. Tento jev byl již dříve popsán u savců, kdy Dkhil *et al.* (2016) provedli studii na potkanech trpících diabetem. Při tomto onemocnění je primární příčinou zvýšení oxidačního stresu hyperglykémie. Při zvýšených hladinách oxidačního stresu došlo u potkanů ke snížení hmotnosti varlat, snížení hladiny testosteronu a změnám v organizační struktuře semenotvorného epitelu. Některé semenotvorné kanálky vykazovaly částečnou či úplnou buněčnou dezorganizaci a absenci spermatogeneze (Dkhil *et al.* 2016).

Podobně působil také diquat u zebříček, působení oxidačního stresu a způsob ochrany proti nim se mezi ptáky a savci zřejmě příliš neliší. U skupiny ovlivněné diquatem došlo v semenotvorných kanálcích kromě nárůstu epitelu i k narušení organizační struktury některých semenotvorných kanálků, některým zcela chybělo lumen. Produkce spermií ale byli schopni všichni samci a k celkovému selhání spermatogeneze nedošlo. U samců potkanů s diabetem byl, stejně jako v mojí studii na zebříčkách, nalezen nárůst počtu kanálků se zvýšenou tloušťkou semenotvorného epitelu (Dkhil *et al.* 2016). Opačný efekt na výšku semenotvorného epitelu ovšem přinesly studie Momeni *et al.* 2012 a Tajjadini *et al.* 2014, které se zabývaly vlivem oxidačního stresu na strukturu tkáně varlat u potkanů. V obou studiích oxidační stres zapříčinil pokles výšky semenotvorného epitelu (Momeni *et al.* 2012; Tajjadini *et al.* 2014). Rozdílné závěry přinesly dále dvě studie potkanů, zabývající se vlivem oxidačního stresu na tloušťku bazální laminy semenotvorných kanálků. Zatímco v první studii měli samci zvýšenou tloušťku bazální laminy oproti kontrolním, ve druhé studii došlo k poklesu její tloušťky (Guneli *et al.* 2008; Boujbiha *et al.* 2009). Tloušťka bazální laminy ve druhé studii klesala spolu se vzrůstající koncentrací chloridu rtuťnatého, kterým byl u potkanů indukován oxidační stres (Boujbiha

et al. 2009). Zvýšené hladiny oxidačního stresu tedy jak u savců, tak u ptáků mění strukturu tkáně a výšku semenotvorného epitelu varlat. Zda se jeho působením výška semenotvorného epitelu sníží nebo zvýší pravděpodobně nebude dáno druhovou specifitou, ale typem a koncentrací látky, kterou je oxidační stres navozován.

Kromě výše uvedené výšky semenotvorného epitelu jsem se v rámci morfologických vlastností varlat zabývala také průměrem jejich semenotvorných kanálků. Průměr semenotvorných kanálků byl statisticky významně snížený u skupiny ovlivněné diquatem a také u skupiny ovlivněné diquatem s luteinem. Samotné podávání luteinu na průměr semenotvorných kanálků nemělo vliv, v kombinaci s diquatem však došlo k nejvýraznějšímu zmenšení jejich průměru. Ke zmenšení průměru semenotvorných kanálků vlivem oxidačního stresu došlo také ve dvou studiích potkanů. Ve studii Guneli *et al.* (2008) byl u potkanů oxidační stres indukován diabetem, a ve studii Momeni *et al.* (2012) arsenem.

Některé studie se, stejně jako moje práce, zabývaly působením antioxidantů a jejich účinky na tkáň varlat. Ve výše zmíněném experimentu Guneli *et al.* (2008) jedné skupině potkanů s diabetem podávali melatonin. Tento hormon, který je u savců produkován epifýzou a u ptáků také rohovkou, má při různých patofyziologických procesech antioxidační a protizánětlivé účinky (Reiter *et al.* 2000). U potkanů s diabetem melatonin dokázal zmenšení průměru semenotvorných kanálků zmírnit (Guneli *et al.* 2008). Studie Dkhil *et al.* (2016) se zabývala antioxidačním a ochranným efektem nanočástic selenu, prvku důležitému pro syntézu testosteronu a vývoj spermií (Behne *et al.* 1996). U potkanů s indukovaným diabetem podávání těchto nanočástic dokázalo patologickým změnám ve tkáni varlat zabránit a semenotvorný epitel vykazoval v porovnání s kontrolní skupinou stejnou strukturu (Dkhil *et al.* 2016). Podávání antioxidantů dokonce může průměr semenotvorných kanálků oproti kontrole zvýšit, což bylo demonstrováno při použití vitaminu E a chloridu manganatého (Momeni *et al.* 2012; Tajjadini *et al.* 2014). Samotným podáváním karotenoidu luteinu v mé práci ke zvýšení průměru semenotvorných kanálků u zebřiček nedošlo, měl na ně tedy neutrální vliv. V kombinaci s diquatem se účinky luteinu jeví jako smíšené. Dokázal sice zabránit zvýšení tloušťky semenotvorného epitelu, dalo by se tedy uvažovat o jeho antioxidačním efektu, v semenotvorných kanálkách ale jeho podávání způsobilo největší pokles jejich průměru. V tomto kontextu pro karotenoid hovoří spíše prooxidační hypotéza. Negativně zde ale mohl působit pouze samotný diquat a účinky luteinu mohly být neutrální, pouze nedokázal negativní vliv diquatu zvrátit.

5.3. Vliv morfometrie varlat na podíl abnormálních spermií v ejakulátu

Bylo zdokumentováno, že působením oxidačního stresu ve tkáni varlat vzniká množství různých patologických změn vedoucích k porušení produkce spermií a vzniku spermií vykazujících různé morfologické abnormality (např. Tajaddini *et al.* 2014; Sajjadian *et al.* 2014). Zajímalo mě tedy, zda mohou morfometrické změny tkáně varlat souviset s podílem abnormálních spermií v ejakulátu. Ani výška semenotvorného epitelu, ani průměr semenotvorných kanálků však na podíl abnormálních spermií neměly vliv. K poškození spermií důsledkem oxidačního stresu totiž nemusí docházet pouze ve varlatech, ale i dále při jejich průchodu pohlavním traktem, zejména v nadvarleti (Tremellen 2008). Plazmatická membrána spermie obsahuje velké množství polynenasycených mastných kyselin, které snadno oxidují a činí tak spermii k poškození volnými kyslíkovými radikály velmi vnímavou (Aitken & Clarkson 1987; Alvarez *et al.* 1987). Kyslíkové radikály dále mohou poškodit přímo DNA a RNA spermií modifikací jejich purinových a pyrimidinových bází či cukerných zbytků nebo fragmentací jejich řetězců (Wiseman & Halliwell 1996; Tremellen 2008).

U lidských spermií byl zdokumentován výrazně vyšší výskyt fragmentace DNA u ejakulovaných spermií v porovnání se spermiemi odebranými z varlat (Greco *et al.* 2005). Zdá se, že spermie, pokud jsou v kontaktu se Sertoliho buňkami, jsou před působením volných kyslíkových radikálů pravděpodobně chráněny (Tesarik *et al.* 2004). Stupeň poškození spermií by hypoteticky mohl narůstat s časem, který uběhl od přerušení tohoto kontaktu. Nelze ale vyloučit, že ejakulované spermie s fragmentovanou DNA neměly predispozice k tomuto poškození vzniklé již během časných fází jejich vývoje ve varleti (Greco *et al.* 2005). Ve studii křepelek rostl počet spermií s fragmentovanou DNA s koncentrací jim podávaného clothianidinu (Tokumoto *et al.* 2013). Je známo, že tento insekticid, běžně užívaný v zemědělství, zvyšuje oxidační stres a může negativně ovlivňovat reprodukční systém ptáků (Gibbons *et al.* 2015). Spolu s podávanou zvyšující se koncentrací insekticidu klesal u samců křepelek v jejich semenotvorném epitelu počet zárodečných buněk. Z těchto výsledků by se dalo předpokládat, že samci, kteří byli vystaveni nejvyšším dávkám insekticidu, budou neplodní. Opak byl ale pravdou a u všech skupin byly v lumen semenotvorných kanálků spermie detekovány. Také počet a váha snesených vajec oplozených studovanými samci se mezi skupinami nelišila. Rozdíly však byly nalezeny mezi délkami embryí. Tento parametr negativně koreloval s koncentrací clothianidinu, jaké byli samci (otcové) vystaveni. Navíc se některá embrya otců ze skupin, kterým byla podávána střední a nejvyšší koncentrace insekticidu, přestala vyvíjet. Z výše uvedeného vyplývá, že clothianidin u křepelek sice nezpůsobil selhání spermatogeneze, nicméně jeho působením došlo k zastavení nebo zpomalení růstu embryí, které pravděpodobně souviselo s fragmentací DNA spermií. Celkově tak měl clothianidin na reprodukční schopnost křepelek negativní vliv (Tokumoto *et al.* 2013). Podobný efekt by mohl mít i diquat u zebříček. Koncentrace diquatu podávaného zebříčkám v mé studii nebyla natolik

vysoká, aby způsobila kromě morfometrických změn ve tkáni varlat selhání spermatogeneze či výrazně narušila morfologii spermií, nelze ale vyloučit poškození na molekulární úrovni (viz dále diskuze o acetylaci α -tubulinu). Podobně jako ve studii provedené na křepelkách, mohl diquat způsobit poškození DNA, které by se později projevilo při vývoji embryí. Bylo by velmi zajímavé tuto skutečnost ověřit v některé z dalších studií.

5.4. Vliv diquatu a luteinu na intenzitu a rovnoměrnost signálu acetylovaného α -tubulinu

Poznatků, které o molekulárních mechanismech ovlivňujících motilitu spermií do dnešních dnů máme, je zatím poměrně málo. Jedním z těchto mechanismů jsou posttranslační modifikace. Ovlivňují stabilitu mikrotubulů, které tvoří cytoskelet buňky a zajišťují její motilitu, jelikož jsou součástí axonem, osních vláken řasinek a bičíků. Acetylace tubulinu je v bičíku důležitou posttranslační modifikací. Tato posttranslační modifikace tubulinu se ukázala být zásadní pro schopnost molekulárního motoru kinesinu vázat se na mikrotubul a pro jeho pohyb po něm (Reed *et al.* 2006).

Dále bylo zjištěno, že pokud je u axonů bičíků míra acetylace α -tubulinu snižena, může být příčinou jejich snížené motility či souviset se strukturním poškozením axonem (Gentleman *et al.* 1996; Reed *et al.* 2006). Z toho důvodu bylo jedním z cílů mé práce detekovat pomocí metody nepřímé immunofluorescence (IF) acetylovaný α -tubulin a u spermií mnou studovaných zebříček z jednotlivých experimentálních skupin porovnat míru intenzity a rovnoměrnost jeho signálu. Bhagwat *et al.* (2014) na výsledcích z IF analýzy přítomnosti acetylované formy α -tubulinu ve spermiích ukázali, že spermie pacientů s poruchou motility vykazovaly přerušovaný signál pro acetylovanou formu α -tubulinu spolu s jeho klesající intenzitou směrem k distálnímu konci bičíku. Oproti tomu spermie mužů bez poruchy motility byly značeny uniformním signálem po celé délce bičíku (Bhagwat *et al.* 2014).

Náš předpoklad byl, že pokud by působením zvýšené hladiny oxidačního stresu u spermií zebříček došlo k jejich poškození, mohl by se signál projevovat podobným způsobem, jako u pacientů s poruchou motility. Rozdíly mezi studovanými skupinami se u zebříček skutečně našly. Průkazný vliv na intenzitu signálu acetylovaného α -tubulinu v bičíku spermií měl diquat a také kombinace diquatu a luteinu. Samci zebříček, kterým byl podáván diquat, měli nejvíce spermií se slabým signálem (průměrně 161 z celkem 200 hodnocených spermií). Naopak nejméně spermií se slabým signálem měli samci, kterým byl podáván diquat zároveň s luteinem (průměrně 101 z celkem 200 hodnocených spermií). Překvapivým výsledkem při hodnocení rovnoměrnosti signálu byl zvýšený počet spermií vykazujících rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu podél bičíku u skupiny ošetřené diquatem (průměrně 74 z celkem 200 hodnocených spermií) oproti kontrole (průměrně 25 z celkem 200 hodnocených spermií). Naopak žádný rozdíl mezi skupinami nebyl nalezen při hodnocení počtu spermií, které měly značený akrozom. Značení akrozomu na hlavičce spermie tak neovlivnila ani jedna

z podávaných látek. Naše výsledky tak ukazují, že hodnocení změn acetylce α -tubulinu je jedním z možných parametrů, který lze u ptáků použít k hodnocení kvality spermií. Ačkoli naše výsledky korelují s výsledky studie provedené Bhagwat *et al.* (2014) jen částečně, je nutné si uvědomit značné rozdíly ve stavbě spermií savců a ptáků. Stejně jako u pacientů s poruchou motility vykazovaly spermie zebříček ošetřené diquatem slabý signál. Ten byl ale stejně intenzivní po celé délce bičíku, směrem k distálnímu konci spermie neslábl. Skupina zebříček ošetřených diquatem navíc měla nejvíce spermií vykazujících rovnoměrný signál ze všech skupin, a naopak přerušovaný signál „v clusterech“ byl detekován nejčastěji v kontrolní skupině. Na základě těchto výsledků se zdá, že na rozdíl od lidí, u ptáků není α -tubulin v axonemě bičíku acetylován rovnoměrně po celé délce. Vzhledem k tomu, že acetylce α -tubulinu v bičíku spermií nebyla ještě u ptáků nikdy dříve studována, a tak naše výsledky nelze porovnat s výsledky jiných skupin, je interpretace našich výsledků značně ztížená. Nelze tak vyloučit, že se mezi jednotlivými druhy mohou nacházet značné rozdíly. Roli v intenzitě a kontinuitě signálu acetylovaného α -tubulinu v bičíku spermie může mít také rozdílná exprese tubulinových izoform, kdy např. u mužů s poruchou motility spermií byla exprese dvou izoform snížena (TUBA3C a TUBA8) a naopak u nich byla detekována exprese třetí izoformy (TUBA4A). Ta se u mužů se zdravými spermiemi vůbec nevyskytovala (Bhagwat *et al.* 2014). Nelze tak ani u ptáků vyloučit expresi nebo naopak snížení exprese některých z dalších tubulinových izoform.

5.5. Vliv intenzity a rovnoměrnosti signálu acetylovaného α -tubulinu na rychlost pohybu spermií

Z výše uvedených informací vyplývá, že acetylce α -tubulinu v několika studiích souvisela s motilitou spermií. Proto jsem se rozhodla ověřit, zda by mohla intenzita, rovnoměrnost a přítomnost signálu acetylovaného α -tubulinu v akrozomu spermií souviset také s rychlostí pohybu spermií zebříček. Ani jedna z hodnocených charakteristik však s rychlostí pohybu spermií nesouvisela. Rozdíly v intenzitě a rovnoměrnosti signálu by tak u zebříček mohly být spíše markerem strukturního poškození bičíků. Studie zabývající se posttranslačními modifikacemi α -tubulinu u infertilních pacientů ukázala, že průměrně 46 % jejich spermií vykazovalo strukturní poškození axonem bičíků (s chybějícími či špatně spárovanými dublety mikrotubulů), zatímco u zdravých mužů bylo takto poškozených jen 10-12 % spermií. U neplodných pacientů byla navíc v porovnání s kontrolou snižena acetylce α -tubulinu na pouhých 30 % (Gentleman *et al.* 1996). Některé práce připisovaly acetylaci stabilizační funkci, díky níž měly být mikrotubuly odolnější proti depolymerizaci (např. Dasgupta *et al.* 1983; L'Hernault a Rosenbaum 1985; Piperno *et al.* 1987). Nicméně jsou práce, které naopak tento vztah nepotvrdily (např. Maruta *et al.* 1986; Kalebic *et al.* 2013).

Zda tedy acetylce tubulinu hraje zásadní roli v regulaci stability a dynamiky mikrotubulů zůstává zatím nejasné. Snížení míry acetylce α -tubulinu by mohlo být způsobeno

bud' přímo nestabilitou mikrotubulů či nepřímo proteiny s acetyltransferázovou aktivitou s mikrotubuly asociovanými (Gentleman *et al.* 1996). Klíčovou acetyltransferázou u savců je tubulin acetyltransferáza TAT1. Při její cílené deleci u myši došlo k poklesu acetylace spermií, ke změnám v jejich morfologii i snížení jejich motility. Samci měli dále sníženou koncentraci spermií v ejakulátu a v porovnání s kontrolními samci zplodili méně potomků (Kalebic *et al.* 2013). Přítomnost této acetyltransferázy tedy u savců zásadně ovlivňuje reprodukční úspěch samců. U ptáků zatím podobné informace chybí a je potřeba další výzkum týkající se této problematiky.

6. Závěr

Cílem předložené práce bylo prozkoumat účinky oxidačního stresu a karotenoidů na spermatogenezi u zebřičky pestré. Oxidační stres byl zebřičkám zvyšován pomocí herbicidu diquatu, k suplementaci karotenoidy byl použit lutein. Ani jedna z těchto látek, ani jejich kombinace neměly žádný vliv na morfologii spermií. Dále nebyly nalezeny rozdíly mezi skupinami v rychlosti pohybu spermií nebo v podílu abnormálních spermií v ejakulátu. Tyto parametry spermií byly hodnoceny u dvou populací zebřiček, populace domestikované a populace blízké divokým zebřičkám. U domestikované populace byla dále provedena morfometrická analýza varlat. Ve tkáni varlat došlo působením diquatu k patologickým změnám. Diquat zapříčinil snížení průměru semenotvorných kanálků a nárůst výšky jejich epitelu. Tento jev byl pozorován také v několika studiích zabývajících se oxidačním stresem u savců. V kombinaci s luteinem bylo snížení průměru semenotvorných kanálků překvapivě největší, lutein však dokázal zabránit alespoň nárůstu výšky jejich epitelu. Patologické změny ve tkáni varlat mohly negativně ovlivnit průběh spermatogeneze, důsledkem které by byla zvýšená produkce morfologicky poškozených spermií. Průměr semenotvorných kanálků a výška jejich epitelu však s podílem abnormálních spermií v ejakulátu nesouvisely. Nicméně nelze u spermií domestikovaných zebřiček vyloučit poškození na molekulární úrovni.

Analýza acetylovaného α -tubulinu ukázala, že diquat u spermií zebřiček způsobil snížení intenzity signálu v bičíku a tento slabý signál vykazovala většina jejich spermií. Pokles intenzity signálu acetylovaného α -tubulinu či snížení počtu acetylovaných spermií v ejakulátu byly ve studiích na lidech spojovány se strukturním poškozením bičíku a poruchou motility. Intenzita signálu acetylovaného α -tubulinu s rychlostí pohybu spermií zebřiček však v naší studii nesouvisela. Podáváním diquatu v kombinaci s luteinem u zebřiček došlo k nárůstu počtu spermií se silnějším signálem a poměry spermií se slabým a silnějším signálem se vyrovnaly.

Prisoudit karotenoidu luteinu jednoznačně pozitivní, negativní či neutrální účinek na spermatogenezi u zebřiček nelze. Na každou z testovaných proměnných totiž působil lutein jinak. Jako neutrální jej lze hodnotit v případě morfologie a rychlosti pohybu spermií. Jeho samotné podávání nemělo průkazný vliv ani na tkáň varlat. Některým studiím se však podáváním antioxidantů povedlo průměr semenotvorných kanálků u savců zvýšit. Za negativní můžeme považovat působení luteinu spolu s diquatem, které překvapivě vedlo k výskytu semenotvorných kanálků s nejmenším průměrem mezi všemi skupinami. Sám lutein zde ale nemusel působit jako negativní hráč, jeho účinky mohly být opět neutrální a za zmenšením průměru semenotvorných kanálků mohl stát pouze diquat, jehož účinky nedokázala přítomnost luteinu zvrátit. V případě snížení výšky semenotvorného epitelu a zvýšení počtu spermií vykazujících silnější signál acetylovaného α -tubulinu při podávání diquatu s luteinem lze hovořit o jeho pozitivním, antioxidačním účinku. Celkově tak karotenoidy na spermatogenezi

u zebříček pestrých měly pozitivní nebo neutrální vliv a při zvýšených hladinách oxidačního stresu hrály důležitou roli v udržení normálního průběhu spermatogeneze.

7. Seznam literatury

- ACKERMAN, D. J., A. J. REINECKE, H. J. ELS, D. G. GROBLER a S. A. REINECKE, 1999.** Sperm Abnormalities Associated with High Copper Levels in Impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 43(3), 261–266. ISSN 0147-6513.
- AIRE, T. A., 1997.** The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 64(4), 291–299. ISSN 0030-2465.
- AIRE, T. A., 2000.** Active spermiophagy in the initial part of the proximal efferent duct of the epididymis of normal domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Research in Veterinary Science* [online]. 68(2), 135–140. ISSN 0034-5288.
- AIRE, T. A. a P. C. OZEGBE, 2012.** Components and development of the centriolar complex during and beyond spermiogenesis in a passeridan bird, the Masked weaver (*Ploceus velatus*). *Tissue and Cell* [online]. 44(1), 63–67. ISSN 0040-8166.
- AIRE, T. A., 2014.** Spermiogenesis in birds. *Spermatogenesis* [online]. 4(3). ISSN 2156-5554.
- AITKEN, R. J. a J. S. CLARKSON, 1987.** Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* [online]. 81(2), 459–469. ISSN 1470-1626, 1741-7899.
- AITKEN, R. J., 1999.** The Amoroso Lecture The human spermatozoon – a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* [online]. 115(1), 1–7. ISSN 1470-1626, 1741-7899.
- ALEXEEFF G. W., 2000.** Public Health Goal for DIQUAT In Drinking Water. Prepared by Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency [online: <http://www.agriculturedefensecoalition.org>].
- ALONSO-ALVAREZ, C., S. BERTRAND, G. DEVEVEY, M. GAILLARD, J. PROST, B. FAIVRE a G. SORCI, 2004a.** An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American Naturalist* [online]. 164(5), 651–659. ISSN 1537-5323.
- ALONSO-ALVAREZ, C., S. BERTRAND, G. DEVEVEY, J. PROST, B. FAIVRE a G. SORCI, 2004b.** Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* [online]. 7(5), 363–368. ISSN 1461-0248.
- ALONSO-ALVAREZ, C., L. PÉREZ-RODRÍGUEZ, R. MATEO, O. CHASTEL a J. VIÑUELA, 2008.** The oxidation handicap hypothesis and the carotenoid allocation trade-off. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. 21(6), 1789–1797. ISSN 1420-9101.
- ALVAREZ, J. G., J. C. TOUCHSTONE, L. BLASCO a B. T. STOREY, 1987.** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*. 8(5), 338–348. ISSN 0196-3635.
- ANDERSON, M. J., 1994.** Sexual selection. Princeton University Press, Princeton
- ANDERSON, M. J. a A. F. DIXSON, 2002.** Sperm competition: motility and the midpiece in primates. *Nature* [online]. 416(6880), 496. ISSN 0028-0836.
- ANDERSON, M. J., A. S. DIXSON a A. F. DIXSON, 2006.** Mammalian sperm and oviducts are sexually selected: evidence for co-evolution. *Journal of Zoology* [online]. 270(4), 682–686. ISSN 1469-7998.
- ANDERSSON, M. a L. W. SIMMONS, 2006.** Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 21(6), Twenty years of TREE - part I, 296–302. ISSN 0169-5347.
- ASHIZAWA, K. a R. SANO, 1990.** Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*. 96(2), 297–301. ISSN 0300-9629.

- AZIZ, N., R. A. SALEH, R. K. SHARMA, I. LEWIS-JONES, N. ESFANDIARI, A. J. THOMAS a A. AGARWAL, 2004.** Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility* [online]. 81(2), 349–354. ISSN 00150282.
- BAKST, M. R. a B. HOWARTH, 1975.** The Head, Neck and Midpiece of Cock Spermatozoa Examined with the Transmission Electron Microscope. *Biology of Reproduction* [online]. 12(5), 632–640. ISSN 0006-3363.
- BALABAN, R. S., S. NEMOTO a T. FINKEL, 2005.** Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* [online]. 120(4), 483–495. ISSN 0092-8674.
- BEHNE, D., H. WEILER a A. KYRIAKOPOULOS, 1996.** Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106(2), 291–297. ISSN 0022-4251.
- BENNISON, C., N. HEMMINGS, L. BROOKES, J. SLATE a T. BIRKHEAD, 2016.** Sperm morphology, adenosine triphosphate (ATP) concentration and swimming velocity: unexpected relationships in a passerine bird. *Proc. R. Soc. B* [online]. 283(1837), 20161558. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- BHAGWAT, S., V. DALVI, D. CHANDRASEKHAR, T. MATTHEW, K.ACHARYA, R. GAJBHIYE, V. KULKARNI, S. SONAWANE, M. GHOSALKAR a P. PARTE, 2014.** Acetylated α -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility. *Fertility and Sterility* [online]. 101(1), 95-104.e3. ISSN 1556-5653.
- BIRKHEAD, T. R., F. M. HUNTER a J. E. PELLATT, 1989.** Sperm competition in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Animal Behaviour* [online]. 38(6), 935–950. ISSN 0003-3472.
- BIRKHEAD, T. R., T. BURKE, R. ZANN, F. M. HUNTER a A. P. KRUPA, 1990.** Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches revealed by DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology* [online]. 27(5), 315–324. ISSN 0340-5443, 1432-0762.
- BIRKHEAD, T. R., J. P. VEIGA a A. P. MØLLER, 1994.** Male sperm reserves and copulation behaviour in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* [online]. 256(1347), 247–251. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- BIRKHEAD, T. R., 1998.** Cryptic Female Choice: Criteria for Establishing Female Sperm Choice. *Evolution* [online]. 52(4), 1212–1218. ISSN 0014-3820.
- BIRKHEAD, T. R., J. G. MARTINEZ, T. BURKE a D. P. FROMAN, 1999.** Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings. Biological sciences* [online]. [vid. 2017-12-10]. ISSN 0962-8452.
- BIRKHEAD, T. R. a T. PIZZARI, 2002.** Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics* [online]. 3(4), 262–273. ISSN 1471-0056.
- BIRKHEAD, T. R., E. J. PELLATT, P. BREKKE, R. YEATES a H. CASTILLO-JUAREZ, 2005.** Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature* [online]. 434(7031), 383–387. ISSN 1476-4687.
- BIRKHEAD, T. R., S. IMMLER, E. J. PELLATT a R. FRECKLETON, 2006.** Unusual Sperm Morphology in the Eurasian Bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) (Morfología Espermática Inusual en *Pyrrhula pyrrhula*). *The Auk*. 123(2), 383–392. ISSN 0004-8038.
- BIRKHEAD, T. R. a S. IMMLER, 2007.** Making sperm: design, quality control and sperm competition. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 65, 175–181. ISSN 1747-3403.
- BLOUNT, J. D., A. P. MØLLER a D. C. HOUSTON, 2001.** Antioxidants, showy males and sperm quality. *Ecology Letters* [online]. 4(5), 393–396. ISSN 1461-0248.
- BLOUNT, J. D., N. B. METCALFE, T. R. BIRKHEAD a P. F. SURAI, 2003.** Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 300(5616), 125–127. ISSN 1095-9203.
- BOUJBIHA, M. A., K. HAMDEN, F. GUERMAZI, A. BOUSLAMA, A. OMEZZINE, A. KAMMOUN a A. E. FEKI, 2009.** Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. *Reproductive Toxicology* [online]. 28(1), 81–89. ISSN 0890-6238.

- BRISKIE, J. V. a R. MONTGOMERIE, 1992.** Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings. Biological Sciences* [online]. 247(1319), 89–95. ISSN 0962-8452.
- BRISKIE, J. V. a R. MONTGOMERIE, 1993.** Patterns of Sperm Storage in Relation to Sperm Competition in Passerine Birds. *The Condor* [online]. 95(2), 442–454. ISSN 0010-5422.
- BRISKIE, J. V. a R. MONTGOMERIE, 1997.** Sexual Selection and the Intromittent Organ of Birds. *Journal of Avian Biology* [online]. 28(1), 73–86. ISSN 0908-8857.
- BRUSH, A. H. a D. M. POWER, 1976.** House Finch Pigmentation: Carotenoid Metabolism and the Effect of Diet. *The Auk*. 93(4), 725–739. ISSN 0004-8038.
- BRUSH, A. H., 1990.** Metabolism of carotenoid pigments in birds. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 4(12), 2969–2977. ISSN 0892-6638.
- BURLEY, N. T., P. G. PARKER a K. LUNDY, 1996.** Sexual selection and extrapair fertilization in a socially monogamous passerine, the zebra finch (*Taeniopygia gullata*). *Behavioral Ecology* [online]. 7(2), 218–226. ISSN 1045-2249.
- BURTON, G. W., 1989.** Antioxidant action of carotenoids. *The Journal of Nutrition*. 119(1), 109–111. ISSN 0022-3166.
- CALHIM, S., S. IMMLER a T. R. BIRKHEAD, 2007.** Postcopulatory Sexual Selection Is Associated with Reduced Variation in Sperm Morphology. *PLOS ONE* [online]. 2(5), e413. ISSN 1932-6203.
- CALHIM, S. a T. R. BIRKHEAD, 2009.** Intraspecific variation in testis asymmetry in birds: evidence for naturally occurring compensation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 276(1665), 2279–2284. ISSN 0962-8452.
- CARDULLO, R. A. a J. M. BALTZ, 1991.** Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton* [online]. 19(3), 180–188. ISSN 0886-1544.
- CLAYTON, N.S., D. HODSON a R.A. ZANN, 1991.** Geographic-Variation in Zebra Finch Subspecies [online]. 91, 2.
- CLERMONT, Y. a E. BUSTOS-OBREGON, 1968.** Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted „in toto". *The American Journal of Anatomy* [online]. 122(2), 237–247. ISSN 0002-9106.
- CLULOW, J. a R. C. JONES, 1982.** Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Journal of Reproduction and Fertility* [online]. 64(2), 259–266. ISSN 1470-1626, 1741-7899.
- COSTANTINI, D. a A. P. MØLLER, 2008.** Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology* [online]. 22(2), 367–370. ISSN 1365-2435.
- DARWIN, CH., 1871.** *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London [online: http://darwin-online.org.uk/converted/pdf/1889_Descent_F969.pdf].
- DASGUPTA, D., R. RAJGOPALAN a S. GURNANI, 1983.** Involvement of colchicine binding site of tubulin in the polymerisation process. *FEBS Letters* [online]. 152(1), 101–104. ISSN 0014-5793.
- DAVIES, M. J., S. FU, H. WANG a R. T. DEAN, 1999.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 27(11–12), 1151–1163. ISSN 0891-5849.
- DAWSON, A., V. M. KING, G. E. BENTLEY a G. F. BALL, 2001.** Photoperiodic Control of Seasonality in Birds. *Journal of Biological Rhythms* [online]. 16(4), 365–380. ISSN 0748-7304.
- DE LAMIRANDE, E. a C. GAGNON, 1992.** Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Journal of Andrology* [online]. 13(5), 368–378. ISSN 1939-4640.

- DIMITROV, B. D., P. G. GADEVA, D. K. BENOVA a M. V. BINEVA, 2006.** Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis* [online]. 21(6), 375–382. ISSN 0267-8357.
- DKHIL, M. A., R. ZRIEQ, S. AL-QURAIISHY a A. E. ABDEL MONEIM, 2016.** Selenium Nanoparticles Attenuate Oxidative Stress and Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules* [online]. 21(11), 1517.
- DONOGHUE, A. M., D. R. HOLSBERGER, D. P. EVENSON a D. P. FROMAN, 1998.** Semen donor selection by in vitro sperm mobility increases fertility and semen storage in the turkey hen. *Journal of Andrology*. 19(3), 295–301. ISSN 0196-3635.
- DVOŘÁKOVÁ, K., H. D. M. MOORE, N. ŠEBKOVÁ a J. PALEČEK, 2005.** Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)* [online]. 130(1), 61–69. ISSN 1470-1626.
- EBERHARD, W. G., 1996.** Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton
- EDGE, R. a T. G. TRUSCOTT, 1997.** Prooxidant and antioxidant reaction mechanisms of carotene and radical interactions with vitamins E and C. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. 13(11–12), 992–994. ISSN 0899-9007.
- ELLEGREN, H., L. GUSTAFSSON a B. C. SHELDON, 1996.** Sex ratio adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(21), 11723–11728. ISSN 0027-8424.
- EL-RAHMAN EL-SHAHAT, A., A. GABR, A. MEKI a E. MEHANA, 2009.** Altered Testicular Morphology and Oxidative Stress Induced by Cadmium in Experimental Rats and Protective Effect of Simultaneous Green Tea Extract. *International Journal of Morphology* [online]. 27, 757–764.
- FAWCETT, D. W., W. A. ANDERSON a D. M. PHILLIPS, 1971.** Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Developmental Biology* [online]. 26(2), 220–251. ISSN 0012-1606.
- FIEDOR, J. a K. BURDA, 2014.** Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* [online]. 6(2), 466–488. ISSN 2072-6643.
- FIERS, W., R. BEYAERT, W. DECLERCQ a P. VANDENABEELE, 1999.** More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* [online]. 18(54), 7719–7730. ISSN 0950-9232
- FINKEL, T. a N. J. HOLBROOK, 2000.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* [online]. 408(6809), 239–247. ISSN 0028-0836.
- FISHER, R. A., 1958.** The genetical theory of natural selection. The genetical theory of natural selection. [online]. (2nd Ed) [vid. 2017-07-18].
- FITZPATRICK, J. L., R. MONTGOMERIE, J. K. DESJARDINS, K. A. STIVER, N. KOLM a S. BALSHINE, 2009.** Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 106(4), 1128–1132. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- FOOTE, C. S., R. W. DENNY, L. WEAVER, Y. CHANG a J. PETERS, 1970.** Quenching of Singlet Oxygen*. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 171(1), 139–148. ISSN 1749-6632.
- FORD, W. C. L., 2006.** Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update* [online]. 12(3), 269–274. ISSN 1355-4786.
- FOUQUET, J., Y. PRIGENT a M. KANN, 1996.** Comparative immunogold analysis of tubulin isoforms in the mouse sperm flagellum: Unique distribution of glutamylated tubulin. *Molecular Reproduction and Development* [online]. 43(3), 358–365. ISSN 1098-2795.
- FREY, R. a W. GOYMANN, 2009.** A single functional testis and long deferent duct papillae: the peculiar male reproductive tract of the classically polyandrous, sex-role reversed Black Coucal. *Journal of Ornithology* [online]. 150(4), 827–838. ISSN 0021-8375, 1439-0361.

- GAGE, M. J. G. a R. P. FRECKLETON, 2003.** Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 270(1515), 625–632. ISSN 0962-8452.
- GAGE, M. J. G., C. P. MACFARLANE, S. YEATES, R. G. WARD, J.B. SEARLE a G. A. PARKER, 2004.** Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current biology: CB*. 14(1), 44–47. ISSN 0960-9822.
- GAGE, M. J. G., A. K. SURRIDGE, J. L. TOMKINS, E. GREEN, L. WISKIN, D. J. BELL a G. M. HEWITT, 2006.** Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Current biology: CB* [online]. 16(6), 612–617. ISSN 0960-9822.
- GENTLEMAN, S., M. I. KAISER-KUPFER, R. J. SHERINS, R. CARUSO, W. G. ROBISON, R. A. LLOYD-MUHAMMAD, M. A. CRAWFORD, A. PIKUS a G. J. CHADER, 1996.** Ultrastructural and biochemical analysis of sperm flagella from an infertile man with a rod-dominant retinal degeneration. *Human Pathology*. 27(1), 80–84. ISSN 0046-8177.
- GIBBONS, I. R., 1981.** Cilia and flagella of eukaryotes. *The Journal of Cell Biology*. 91(3 Pt 2), 107s-124s. ISSN 0021-9525.
- GIBBONS, D., C. MORRISSEY a P. MINEAU, 2015.** A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 22(1), 103–118. ISSN 0944-1344, 1614-7499.
- GÓES, R. M. a H. DOLDER, 2002.** Cytological steps during spermiogenesis in the house sparrow (*Passer domesticus*, Linnaeus). *Tissue and Cell* [online]. 34(4), 273–282. ISSN 0040-8166.
- GOMENDIO, M. a E. R. ROLDAN, 1991.** Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings. Biological Sciences* [online]. 243(1308), 181–185. ISSN 0962-8452.
- GOMENDIO, M. a E. R. S. ROLDAN, 1993.** Coevolution between Male Ejaculates and Female Reproductive Biology in Eutherian Mammals. *Proceedings: Biological Sciences*. 252(1333), 7–12. ISSN 0962-8452.
- GRAVES, G. R., 2004.** Testicular Volume and Asymmetry Are Age-Dependent in Black-Throated Blue Warblers (*Dendroica caerulescens*). *The Auk* [online]. 121(2), 473–485. ISSN 0004-8038.
- GRECO, E., F. SCARSELLI, M. IACOBELLI, L. RIENZI, F. UBALDI, S. FERRERO, G. FRANCO, N. ANNIBALLO, C. MENDOZA a J. TESARIK, 2005.** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction* [online]. 20(1), 226–230. ISSN 0268-1161.
- GREENLEE, A. R., T. M. ELLIS a R. L. BERG, 2004.** Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environmental Health Perspectives*. 112(6), 703–709. ISSN 0091-6765.
- GRIFFITH, S. C., C. E. HOLLELEY, M. M. MARIETTE, S. R. PRYKE a N. SVEDIN, 2010.** Low level of extrapair parentage in wild zebra finches. *Animal Behaviour* [online]. 79(2), 261–264. ISSN 0003-3472.
- GUNELI, E., K. TUGYAN, H. OZTURK, M. GUMUSTEKIN, S. CILAKER a N. UYSAL, 2008.** Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. *European Surgical Research* [online]. 40(4), 354–360. ISSN 0014-312X, 1421-9921.
- GUTTERIDGE, J. M., 1995.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. 41(12 Pt 2), 1819–1828. ISSN 0009-9147.
- HAMPTON, M. B., A. J. KETTLE a C. C. WINTERBOURN, 1998.** Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*. 92(9), 3007–3017. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- HARMAN, D., 1956.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 298–300.
- HARTLEY, R. C. a M. W. KENNEDY, 2004.** Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 19(7), 353–354. ISSN 0169-5347.

- HAU, M., M. WIKELSKI a J. C. WINGFIELD, 1998.** A neotropical forest bird can measure the slight changes in tropical photoperiod. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [online]. 265(1391), 89–95. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- HELFENSTEIN, F., M. ÅLUND a H. RICHNER, 2010a.** Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* [online]. 64, 557–565.
- HELFENSTEIN, F., S. LOSDAT, A. P. MØLLER, J. D. BLOUNT a H. RICHNER, 2010b.** Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecology Letters* [online]. 13(2), 213–222. ISSN 1461-0248.
- HENNEKENS, C. H., S. L. MAYRENT a W. WILLETT, 1986.** Vitamin A, carotenoids, and retinoids. *Cancer* [online]. 58(S8), 1837–1841. ISSN 1097-0142.
- HIGUCHI, M., Y. YOSHIKAWA, K. ORINO a K. WATANABE, 2011.** Effect of diquat-induced oxidative stress on iron metabolism in male Fischer-344 rats. *BioMetals* [online]. 24(6), 1123–1131. ISSN 0966-0844, 1572-8773.
- HILL, G. E., 1991.** Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature* [online]. 350(6316), 337–339. ISSN 0028-0836.
- HILL, G. E., 1996.** Redness as a measure of the production cost of ornamental coloration. *Ethology Ecology & Evolution* [online]. 8(2), 157–175. ISSN 0394-9370.
- HILL, G. E., C.Y. INOUE a R. MONTGOMERIE, 2002.** Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 269(1496), 1119–1124. ISSN 0962-8452.
- HOCKING, P. M., 1992.** Bilateral testicular asymmetry and supernumerary testes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *British Poultry Science* [online]. 33(2), 455–460. ISSN 0007-1668.
- HOLSTEIN, A.-F., 1978.** Spermatophagy in the Seminiferous Tubules and Excurrent Ducts of the Testis in Rhesus Monkey and in Man*. *Andrologia* [online]. 10(5), 331–352. ISSN 1439-0272.
- HORROCKS, A. J., S. STEWART, L. JACKSON a G. J. WISHART, 2000.** Induction of Acrosomal Exocytosis in Chicken Spermatozoa by Inner Perivitelline-Derived N-linked Glycans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 278(1), 84–89. ISSN 0006-291X.
- CHIBA, A., M. NAKAMURA a G. MORIMOTO, 2011.** Spermiophagy in the male reproductive tract of some passerine birds. *Zoological Science* [online]. 28(9), 689–693. ISSN 0289-0003.
- IMMLER, S., H. D. M. MOORE, W. G. BREED a T. R. BIRKHEAD, 2007.** By Hook or by Crook? Morphometry, Competition and Cooperation in Rodent Sperm. *PLOS ONE* [online]. 2(1), e170. ISSN 1932-6203.
- IMMLER, S., S. GRIFFITH, R. ZANN a T. R. BIRKHEAD, 2012.** Intra-specific variance in sperm morphometry: a comparison between wild and domesticated Zebra Finches *Taeniopygia guttata*. *Ibis* [online]. 154(3), 480–487. ISSN 0019-1019.
- IWASAKI, A. a C. GAGNON, 1992.** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients**Supported by grant MT-6490 from the Medical Research Council of Canada (to C.G.). *Fertility and Sterility* [online]. 57(2), 409–416. ISSN 0015-0282.
- JAMIESON G. M., 2007.** *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds: Phylogeny, Morphology, Hormones and Fertilization*. Volume 6A of Series. Published by Science Publishers, Enfield, NH, USA. ISBN (Vol 6 Pt A) 978-1-57808-386-2
- JONES, R., T. MANN a R. J. SHERINS, 1978.** Adverse Effects of Peroxidized Lipid on Human Spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (Great Britain) [online]. 201, 413–7.
- KALEBIC, N., S. SORRENTINO, E. PERLAS, G. BOLASCO, C. MARTINEZ a P. A. HEPPENSTALL, 2013.** α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nature Communications* [online]. 4, 1962. ISSN 2041-1723.

KELLY, C. D. a M. D. JENNIONS, 2011. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* [online]. 86(4), 863–884. ISSN 1469-185X.

KEMPENAERS, B., K. PEER, E. L. M. VERMEIRSEN a R. J. ROBERTSON, 2002. Testis size and asymmetry in the tree swallow: A test of the compensation hypothesis. *Avian Science*. 2, 115–122. ISSN 1424-8743.

KILGALLON, S. J. a L.W. SIMMONS, 2005. Image content influences men's semen quality. *Biology Letters* [online]. 1(3), 253–255. ISSN 1744-9561.

KLEVEN, O., F. FOSSØY, T. LASKEMOEN, R. J. ROBERTSON, G. RUDOLFSEN a J. T. LIFJELD, 2009. Comparative Evidence for the Evolution of Sperm Swimming Speed by Sperm Competition and Female Sperm Storage Duration in Passerine Birds. *Evolution* [online]. 63(9), 2466–2473. ISSN 1558-5646.

KORN, N., R. J. THURSTON, B. P. POOSER a T. R. SCOTT, 2000. Ultrastructure of spermatozoa from Japanese quail. *Poultry Science*. 79(1), 86–93. ISSN 0032-5791.

KUBO-IRIE, M., K. MATSUMIYA, T. IWAMOTO, S. KANEKO a S. ISHIJIMA, 2005. Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. *Molecular Reproduction and Development* [online]. 70(1), 70–81. ISSN 1098-2795.

KUENZEL, W. J., 2000. Central nervous system regulation of gonadal development in the avian male. *Poultry Science* [online]. 79(11), 1679–1688. ISSN 0032-5791.

LAMUNYON, C. W. a S. WARD, 1998. Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings. Biological Sciences* [online]. 265(1409), 1997–2002. ISSN 0962-8452.

LASKEMOEN, T., F. FOSSØY, G. RUDOLFSEN a J. T. LIFJELD, 2008. Age-Related Variation in Primary Sexual Characters in a Passerine with Male Age-Related Fertilization Success, the Bluethroat *Luscinia svecica*. *Journal of Avian Biology*. 39(3), 322–328. ISSN 0908-8857.

LEMOINE, M., I. GRASSEAU, J. P. BRILLARD a E. BLESBOIS, 2008. A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)* [online]. 136(4), 391–399. ISSN 1741-7899.

L'HERNAULT, S. W. a J. L. ROSENBAUM, 1983. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *The Journal of Cell Biology*. 97(1), 258–263. ISSN 0021-9525.

L'HERNAULT, S. W. a J. L. ROSENBAUM, 1985. Chlamydomonas .alpha.-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the .epsilon.-amino group of a lysine. *Biochemistry* [online]. 24(2), 473–478. ISSN 0006-2960.

LIFJELD, J. T., T. LASKEMOEN, O. KLEVEN, A. T. M. PEDERSEN, H. M. LAMPE, G. RUDOLFSEN, T. SCHMOLL a T. SLAGSVOLD, 2012. No Evidence for Pre-Copulatory Sexual Selection on Sperm Length in a Passerine Bird. *PLOS ONE* [online]. 7(2), e32611. ISSN 1932-6203.

LIFJELD, J. T., A. HOENEN, L. E. JOHANNESSEN, T. LASKEMOEN, R. J. LOPES, P. RODRIGUES a M. ROWE, 2013. The Azores bullfinch (*Pyrrhula murina*) has the same unusual and size-variable sperm morphology as the Eurasian bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Biological Journal of the Linnean Society* [online]. 108(3), 677–687. ISSN 0024-4066.

LIU, C., R. M. RUSSELL a X.-D. WANG, 2004. Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro. *The Journal of Nutrition*. 134(2), 426–430. ISSN 0022-3166.

LIU, X.-F., L.-M. ZHANG, H.-N. GUAN, Z.-W. ZHANG a S.-W. XU, 2013. Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 60, 168–176. ISSN 0278-6915.

LJUNGMAN, M. a P. C. HANAWALT, 1992. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Molecular carcinogenesis*. 5(4), 264–269.

- LOPATA, A., 2009.** History of the Egg in Embryology. *Journal of Mammalian Ova Research* [online]. 26(1), 2–9. ISSN 1341-7738.
- LOSDAT, S., H. RICHNER, J. D. BLOUNT a F. HELFENSTEIN, 2011.** Immune Activation Reduces Sperm Quality in the Great Tit. *PLOS ONE* [online]. 6(7), e22221. ISSN 1932-6203.
- LUDUEÑA, R. F., 1998.** Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International Review of Cytology*. 178, 207–275. ISSN 0074-7696.
- LÜPOLD, S., S. CALHIM, S. IMMLER a T. R. BIRKHEAD, 2009.** Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [online]. 276(1659), 1175–1181. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- LÜPOLD, S., M. K. MANIER, N. PUNIAMOORTHY, C. SCHOFF, W. T. STARMER, S. H. Buckley LUEPOLD, J. M. BELOTE a S.PITNICK, 2016.** How sexual selection can drive the evolution of costly sperm ornamentation. *Nature* [online]. 533(7604), 535–538. ISSN 1476-4687.
- MACLEOD, J., 1943.** THE ROLE OF OXYGEN IN THE METABOLISM AND MOTILITY OF HUMAN SPERMATOZOA. *American Journal of Physiology-Legacy Content* [online]. 138(3), 512–518. ISSN 0002-9513.
- MARUTA, H., K. GREER a J. L. ROSENBAUM, 1986.** The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 103(2), 571–579. ISSN 0021-9525.
- MAUTZ, B. S., A. P. MØLLER a M. D. JENNIONS, 2013.** Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? A meta-analysis. *Biological Reviews* [online]. 88(3), 669–682. ISSN 1469-185X.
- MCGRAW, K. J., A. J. GREGORY, R. S. PARKER a E. ADKINS-REGAN, 2003.** Diet, Plasma Carotenoids, and Sexual Coloration in the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *The Auk* [online]. 120(2), 400–410. ISSN 0004-8038.
- MCKEAN, P. G., S. VAUGHAN a K. GULL, 2001.** The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*. 114(Pt 15), 2723–2733. ISSN 0021-9533.
- MILLER, G. T. a S. PITNICK, 2002.** Sperm-female coevolution in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 298(5596), 1230–1233. ISSN 1095-9203.
- MØLLER, A. P., 1994.** Directional selection on directional asymmetry: testes size and secondary sexual characters in birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* [online]. 258(1352), 147–151. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- MØLLER, A. P. a J. V. BRISKIE, 1995.** Extra-Pair Paternity, Sperm Competition and the Evolution of Testis Size in Birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 36(5), 357–365. ISSN 0340-5443.
- MOMENI, H. R., S. ORYAN a N. ESKANDARI, 2012.** Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. *Reproductive Biology* [online]. 12(2), 171–181. ISSN 1642431X.
- MOORE, H., K. DVOŘÁKOVÁ, N. JENKINS a W. BREED, 2002.** Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* [online]. 418(6894), 174–177. ISSN 1476-4687.
- MORA, A. R., A. FIRTH, S. BLAREAU, A. VALLAT a F. HELFENSTEIN, 2017.** Oxidative stress affects sperm performance and ejaculate redox status in subordinate House Sparrows. *Journal of Experimental Biology* [online]. jeb.154799. ISSN 0022-0949, 1477-9145.
- MOSSMAN, J., J. SLATE, S. HUMPHRIES a T. BIRKHEAD, 2009.** SPERM MORPHOLOGY AND VELOCITY ARE GENETICALLY CODETERMINED IN THE ZEBRA FINCH. *Evolution* [online]. 63(10), 2730–2737. ISSN 1558-5646.
- MURAKAMI, M., A. SUGITA, T. SHIMADA a T. YOSHIMURA, 1978.** Scanning electron microscope observation of the seminal vesicle in the Japanese monkey with special reference to intraluminal spermiophagy by macrophages. *Archivum Histologicum Japonicum = Nihon Soshikigaku Kiroku*. 41(3), 275–283. ISSN 0004-0681.
- NASCIMENTO, J. M., L. Z. SHI, S. MEYERS, P. GAGNEUX, N. M. LOSKUTOFF, E. L. BOTVINICK a M. W. BERNIS, 2008.** The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 5(20), 297–302. ISSN 1742-5689, 1742-5662.

- NEMOTO, S., K. TAKEDA, Z.-X. YU, V. J. FERRANS a T. FINKEL, 2000.** Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 20(19), 7311–7318. ISSN 0270-7306, 1098-5549.
- NIXON, B., K. A. EWEN, K. M. KRIVANEK, J. CLULOW, G. KIDD, H. ECROYD a R. C. JONES, 2014.** Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction* [online]. 147(3), 265–277. ISSN 1470-1626, 1741-7899.
- NOGALES, E., M. WHITTAKER, R. A. MILLIGAN a K. H. DOWNING, 1999.** High-resolution model of the microtubule. *Cell*. 96(1), 79–88. ISSN 0092-8674.
- OLSON, V. A. a I. P. F. OWENS, 1998.** Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 13(12), 510–514. ISSN 0169-5347.
- OLSON, V. A. a I. P. F. OWENS, 2005.** Interspecific variation in the use of carotenoid-based coloration in birds: diet, life history and phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. 18(6), 1534–1546. ISSN 1420-9101.
- OWENS, I. P. F. a I. R. HARTLEY, 1998.** Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 265(1394), 397–407. ISSN 0962-8452.
- PACKER, J. E., J. S. MAHOOD, V. O. MORA-ARELLANO, T. F. SLATER, R. L. WILLSON a B. S. WOLFENDEN, 1981.** Free radicals and singlet oxygen scavengers: Reaction of a peroxy-radical with β -carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo(2,2,2)-octane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 98(4), 901–906. ISSN 0006-291X.
- PALOZZA, P., 1998.** Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*. 56(9), 257–265. ISSN 0029-6643.
- PAMPLONA, R., 2008.** Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 1777(10), 1249–1262. ISSN 0005-2728.
- PARKER, G. A., 1970.** Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in the Insects. *Biological Reviews* [online]. 45(4), 525–567. ISSN 1469-185X.
- PARREIRA, G. G., R. C. N. MELO a L. D. RUSSELL, 2002.** Relationship of sertoli-sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views. *Biology of Reproduction*. 67(4), 1232–1241. ISSN 0006-3363.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, L., 2009.** Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* [online]. 31(10), 1116–1126. ISSN 1521-1878.
- PETERS, A., A. G. DENK, K. DELHEY a B. KEMPENAERS, 2004.** Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. 17(5), 1111–1120. ISSN 1420-9101.
- PIKE, T. W., J. D. BLOUNT, B. BJERKENG, J. LINDSTRÖM a N. B. METCALFE, 2007.** Carotenoids, oxidative stress and female mating preference for longer lived males. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [online]. 274(1618), 1591–1596. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- PIPERNO, G., M. LEDIZET a X. J. CHANG, 1987.** Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of Cell Biology*. 104(2), 289–302. ISSN 0021-9525.
- PITCHER, T. E., P. O. DUNN a L. A. WHITTINGHAM, 2005.** Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. 18(3), 557–567. ISSN 1420-9101.
- PITNICK, S, T A MARKOW a G S SPICER, 1995.** Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(23), 10614–10618. ISSN 0027-8424.

- PITNICK, S., 1996.** Investment in Testes and the Cost of Making Long Sperm in *Drosophila*. *The American Naturalist*. 148(1), 57–80. ISSN 0003-0147.
- PIZZARI, T. a K. R. FOSTER, 2008.** Sperm Sociality: Cooperation, Altruism, and Spite. *PLOS Biology* [online]. 6(5), e130. ISSN 1545-7885.
- PRIGENT, Y., M. L. KANN, H. LACH-GAR, I. PÉCHART a J. P. FOUQUET, 1996.** Glutamylated tubulin as a marker of microtubule heterogeneity in the human sperm flagellum. *Molecular Human Reproduction*. 2(8), 573–581. ISSN 1360-9947.
- RAJENDRAN, R., R. MINQIN, M. D. YNSA, G. CASADESUS, M. A. SMITH, G. PERRY, B. HALLIWELL a F. WATT, 2009.** A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits—Insights into the pathology of Alzheimer’s disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 382(1), 91–95. ISSN 0006-291X.
- REED, N. A., D. CAI, T. L. BLASIUS, G. T. JIH, E. MEYHOFER, J. GAERTIG a K. J. VERHEY, 2006.** Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology* [online]. 16(21), 2166–2172. ISSN 0960-9822.
- REITER, R. J., D. X. TAN, C. OSUNA a E. GITTO, 2000.** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of Biomedical Science* [online]. 7(6), 444–458. ISSN 1021-7770.
- ROBB, G. W., R. P. AMANN a G. J. KILLIAN, 1978.** Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54(1), 103–107. ISSN 0022-4251.
- ROBERTS, Kenneth P., 1998.** Y-Chromosome Deletions and Male Infertility: State of the Art and Clinical Implications. *Journal of Andrology* [online]. 19(3), 255–259. ISSN 1939-4640.
- ROWE, M. a K. J. MCGRAW, 2008.** CAROTENOIDS IN THE SEMINAL FLUID OF WILD BIRDS: INTERSPECIFIC VARIATION IN FAIRY-WRENS. *The Condor* [online]. 110(4), 694–700. ISSN 0010-5422, 1938-5129.
- ROWE, M., T. LASKEMOEN, A. JOHNSEN a J. T. LIFJELD, 2013.** Evolution of sperm structure and energetics in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [online]. 280(1753), 20122616. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- SAJJADIAN, F., L. ROSHANGAR, A. HEMMATI, M. NORI, S. SOLEIMANI-RAD a J. SOLEIMANI-RAD, 2014.** The effect of BSO-induced oxidative stress on histologic feature of testis: testosterone secretion and semen parameters in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 17(8), 606–612. ISSN 2008-3866.
- SEDQYAR, M., Q.WENG, G. WATANABE, M. M. M. KANDIEL, S. TAKAHASHI, A. K. SUZUKI, S. TANEDA a K. TAYA, 2008.** Secretion of inhibin in male Japanese quail (*Coturnix japonica*) from one week of age to sexual maturity. *The Journal of Reproduction and Development*. 54(2), 100–106. ISSN 0916-8818.
- SHELDON, B. C., 1994.** Male Phenotype, Fertility, and the Pursuit of Extra-Pair Copulations by Female Birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* [online]. 257(1348), 25–30. ISSN 0962-8452, 1471-2954.
- SHELDON, B. C., J. MERILA, A. QVARNSTRÖM, L. GUSTAFSSON a H. ELLEGREN, 1997.** Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by size of male secondary sexual character. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 264(1380), 297–302. ISSN 0962-8452.
- SHIDA, T., J. G. CUEVA, Z. XU, M. B. GOODMAN a M. V. NACHURY, 2010.** The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 107(50), 21517–21522. ISSN 1091-6490.
- SIEFERMANN-HARMS, D., 1987.** The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* [online]. 69(3), 561–568. ISSN 1399-3054.
- SIEMS, W., I. WISWEDEL, C. SALERNO, C. CRIFÒ, W. AUGUSTIN, L. SCHILD, C.-D. LANGHANS a O. SOMMERBURG, 2005.** β -Carotene breakdown products may impair mitochondrial functions — potential side

effects of high-dose β -carotene supplementation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 16(7), 385–397. ISSN 0955-2863.

SIES, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* [online]. 215(2), 213–219. ISSN 1432-1033.

SIES, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* [online]. 82(2), 291–295. ISSN 1469-445X.

SIMONS, M. J. P. a S. VERHULST, 2011. Zebra finch females prefer males with redder bills independent of song rate—a meta-analysis. *Behavioral Ecology* [online]. 22(4), 755–762. ISSN 1045-2249.

SIMONS, M. J. P., A. A. COHEN a S. VERHULST, 2012. What Does Carotenoid-Dependent Coloration Tell? Plasma Carotenoid Level Signals Immunocompetence and Oxidative Stress State in Birds—A Meta-Analysis. *PLOS ONE* [online]. 7(8), e43088. ISSN 1932-6203.

SMITH, C. V., H. HUGHES, B. H. LAUTERBURG a J. R. MITCHELL, 1985. Oxidant stress and hepatic necrosis in rats treated with diquat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 235(1), 172–177. ISSN 0022-3565, 1521-0103.

SNOOK, R. R., 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 20(1), 46–53. ISSN 0169-5347.

SONG, Y. a S. T. BRADY, 2015. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in Cell Biology* [online]. 25(3), 125–136. ISSN 0962-8924.

STANCLIFFE, T. C. a Antoinette PIRIE, 1971. The production of superoxide radicals in reactions of the herbicide diquat. *FEBS Letters* [online]. 17(2), 297–299. ISSN 0014-5793.

STARKOV, A. A., 2008. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1147(1), 37–52. ISSN 1749-6632.

ST-PIERRE, J., J. A. BUCKINGHAM, S. J. ROEBUCK a M. D. BRAND, 2002. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 277(47), 44784–44790. ISSN 0021-9258, 1083-351X.

TAJADDINI, S., S. EBRAHIMI, B. BEHNAM, M. BAKHTIYARI, M. T. JOGHATAEI, M. ABBASI, M. AMINI, S. AMANPOUR a M. KORUJI, 2014. Antioxidant effect of manganese on the testis structure and sperm parameters of formalin-treated mice. *Andrologia* [online]. 46(3), 246–253. ISSN 1439-0272.

TESARIK, J., 2004. Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Human Reproduction* [online]. 19(2), 254–261. ISSN 1460-2350.

TOKUMOTO, J., M. DANJO, Y. KOBAYASHI, K. KINOSHITA, T. OMOTEHARA, A. TATSUMI, M. HASHIGUCHI, T. SEKIJIMA, H. KAMISOYAMA, T. YOKOYAMA, H. KITAGAWA a N. HOSHI, 2013. Effects of Exposure to Clothianidin on the Reproductive System of Male Quails. *Journal of Veterinary Medical Science* [online]. 75(6), 755–760. ISSN 0916-7250, 1347-7439.

TOMÁŠEK, O., B. GABRIELOVÁ, P. KAČER, P. MARŠÍK, J. SVOBODOVÁ, K. SYSLOVÁ, M. VINKLER a T. ALBRECHT, 2016. Opposing effects of oxidative challenge and carotenoids on antioxidant status and condition-dependent sexual signalling. *Scientific Reports* [online]. 6, srep23546. ISSN 2045-2322.

TOMÁŠEK, O., J. ALBRECHTOVÁ, M. NĚMCOVÁ, P. OPATOVÁ a T. ALBRECHT, 2017. Trade-off between carotenoid-based sexual ornamentation and sperm resistance to oxidative challenge. *Proc. R. Soc. B* [online]. 284(1847), 20162444. ISSN 0962-8452, 1471-2954.

TOURMENTE M., ROWE M., GONZÁLEZ-BARROSO M. M., RIAL E., GOMENDIO M. a ROLDAN E. R. S., 2013. Postcopulatory sexual selection increases atp content in rodent spermatozoa. *Evolution* [online]. 67(6), 1838–1846. ISSN 0014-3820.

- TREMELLEN, K., 2008.** Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Human Reproduction Update* [online]. 14(3), 243–258. ISSN 1460-2369.
- UBUKA, T., G. E. BENTLEY, K. UKENA, J. C. WINGFIELD a K. TSUTSUI, 2005.** Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 102(8), 3052–3057. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- VAN DER WERF, H. M. G., 1996.** Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [online]. 60(2), 81–96. ISSN 0167-8809.
- VERNON, G. G. a D. M. WOOLLEY, 1999.** Three-dimensional motion of avian spermatozoa. *Cell Motility and the Cytoskeleton* [online]. 42(2), 149–161. ISSN 0886-1544.
- VILAR, O., P. GIOVENCO a J. C. CALAMERA, 1980.** Adenosinetriphosphate (ATP) in human spermatozoa. II. Concentrations in fertile men. *Andrologia*. 12(3), 225–227. ISSN 0303-4569.
- VINKLER, M. a T. ALBRECHT, 2010.** Carotenoid maintenance handicap and the physiology of carotenoid-based signalisation of health. *Die Naturwissenschaften* [online]. 97(1), 19–28. ISSN 1432-1904.
- VON SCHANTZ, T, S. BENSCH, M. GRAHN, D. HASSELQUIST a H. WITTZELL, 1999.** Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 266(1414), 1–12. ISSN 0962-8452.
- WEI, T., V. SIMKO, 2016.** R package 'corrplot': visualization of a correlation matrix- Matrix R Package v. 0.77.
- WELLS, P. G., P. M. KIM, R. R LAPOSA, C. J NICOL, T. PARMANA a L. M WINN, 1997.** Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 396(1–2), 65–78. ISSN 0027-5107.
- WISEMAN, H. a B. HALLIWELL, 1996.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*. 313(Pt 1), 17–29. ISSN 0264-6021.
- WHITTINGHAM, L. A. a P. O. DUNN, 2005.** Effects of extra-pair and within-pair reproductive success on the opportunity for selection in birds. *Behavioral Ecology* [online]. 16(1), 138–144. ISSN 1045-2249.
- WOLFSON, A., 1952.** The Cloacal Protuberance: A Means for Determining Breeding Condition in Live Male Passerines. *Bird-Banding* [online]. 23(4), 159–165. ISSN 0006-3630.
- YAKES, F. M. a B. VAN HOUTEN, 1997.** Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(2), 514–519. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- YUAN, Y., S. GE, Z. LV, M. WU, H. KUANG, B. YANG, J. YANG, L. WU, W. ZOU a D. ZHANG, 2017.** Attenuation of perfluorooctanoic acid-induced testicular oxidative stress and apoptosis by quercetin in mice. *RSC Advances* [online]. 7(71), 45045–45052.
- ZAHAVI, A., 1975.** Mate selection—A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 53, issue 1, s. 205-214
- ZANN R. A., 1996.** The zebra finch: A synthesis of field and laboratory studies. Oxford University Press, Oxford, New York.

8. Přílohy

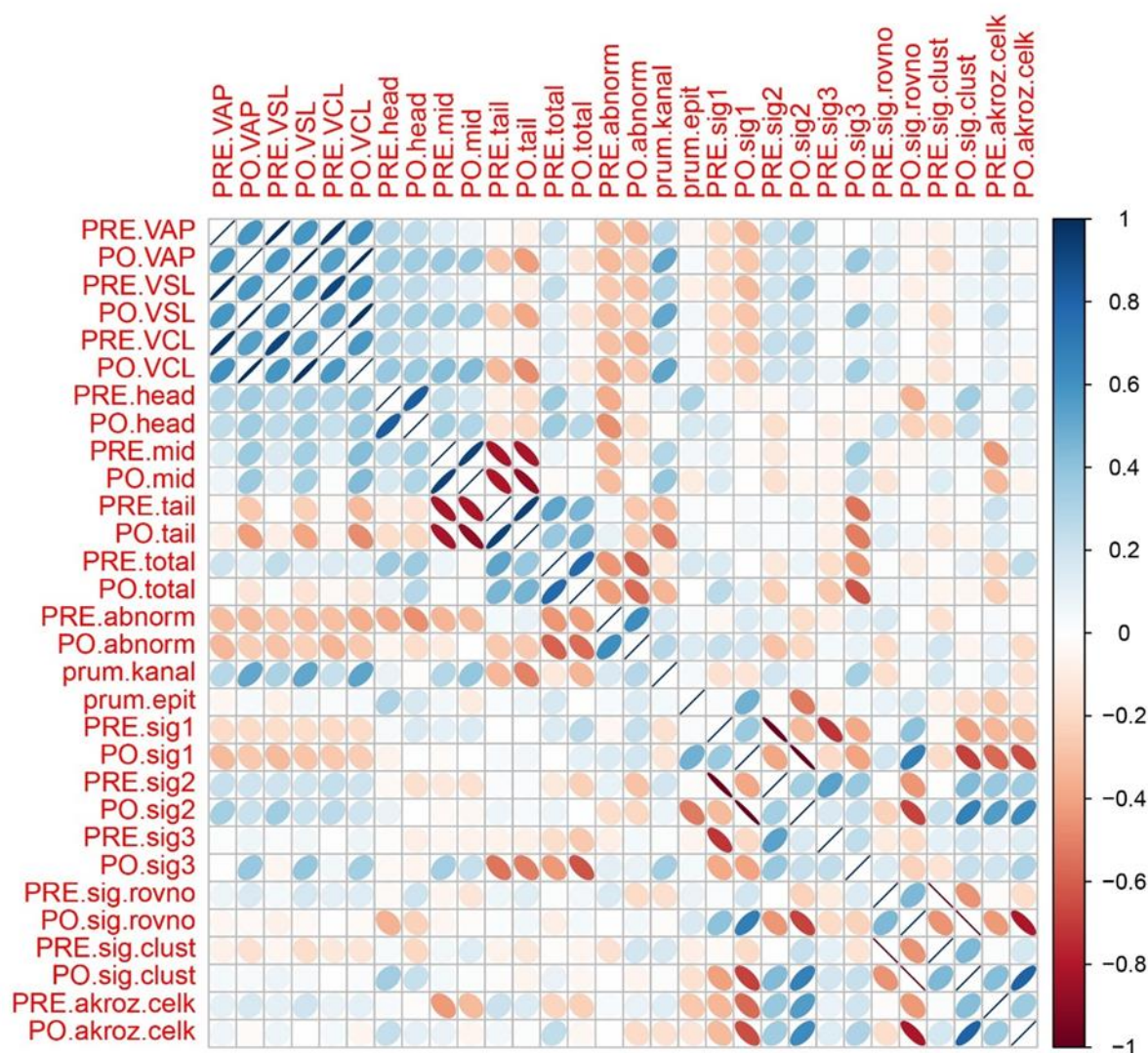
Příloha 1: Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených před experimentem v roce 2011. Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear.

Skupina	Kontrola		Diquat		Lutein		Diquat:Lutein	
Proměnná	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka
VAP	15	63.944 10.450	15	63.483 11.986	15	67.787 9.125	15	66.733 11.223
VSL	15	61.392 10.598	15	60.954 12.628	15	65.924 9.536	15	63.693 10.161
VCL	15	68.745 10.403	15	68.356 10.911	15	71.021 8.794	15	71.292 11.972
délka hlavičky	15	12.601 0.708	15	12.186 0.394	15	12.327 0.835	15	12.312 0.717
délka střední části bičíku	15	26.552 6.606	15	25.109 5.532	15	26.899 5.736	15	27.654 5.900
délka hlavní části bičíku	15	35.027 8.481	15	35.698 6.112	15	33.587 6.335	15	32.151 6.895
celková délka	15	74.181 3.910	15	72.993 4.022	15	72.813 3.798	15	72.118 2.684
podíl abnorm. spermií	15	0.069 0.036	15	0.100 0.091	15	0.093 0.084	15	0.058 0.048
signál 1	8	105.250 57.840	6	126.167 64.820	8	100.125 52.370	6	118.833 62.411
signál 2	8	81.625 44.716	6	66.500 34.665	8	92.625 49.042	6	73.000 39.165
signál 3	8	13.125 9.196	6	7.333 5.483	8	7.250 5.890	6	8.167 5.849
rovnom. signál	8	27.000 14.667	6	42.333 21.773	8	33.250 17.548	6	45.333 25.116
signál clustery	8	173.000 89.453	6	157.667 80.034	8	166.750 86.185	6	154.667 79.080
signál akrozom celkem	8	159.625 83.694	6	127.500 70.148	8	166.250 86.582	6	145.167 74.939

Příloha 2: Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených po experimentu v roce 2011. Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear.

Skupina	Kontrola		Diquat		Lutein		Diquat:Lutein	
Proměnná	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka
VAP	15	66.871 10.349	13	65.333 25.282	15	71.277 10.824	12	71.514 31.806
VSL	15	63.923 9.866	13	63.598 24.671	15	69.604 10.779	12	69.198 30.902
VCL	15	71.957 11.362	13	68.942 26.471	15	74.522 11.217	12	75.773 33.378
délka hlavičky	15	12.000 0.691	13	11.555 4.087	15	11.769 0.674	11	11.695 5.381
délka střední části bičíku	15	25.031 6.801	13	23.237 9.574	15	24.927 5.020	11	23.806 11.914
délka hlavní části bičíku	15	33.582 8.247	13	35.004 13.262	15	32.836 5.672	11	33.195 16.381
celková délka	15	70.613 3.077	13	69.796 24.785	15	69.532 2.451	11	68.696 31.553
podíl abnorm. spermii	14	0.160 0.111	12	0.150 0.107	15	0.119 0.053	11	0.100 0.069
signál 1	8	113.750 60.718	6	161.000 83.240	8	117.500 61.668	6	101.333 54.487
signál 2	8	81.375 44.194	6	36.667 24.450	8	76.625 40.904	6	90.667 49.625
signál 3	8	4.875 3.979	6	2.333 2.344	8	5.875 3.623	6	8.000 7.292
rovnom. signál	8	25.375 13.840	6	73.667 41.826	8	30.750 20.528	6	47.333 25.611
signál clustery	8	174.625 90.286	6	126.333 66.768	8	169.250 88.363	6	152.667 77.930
signál akrozom celkem	8	161.125 83.677	6	131.000 69.667	8	154.500 81.110	6	159.167 81.458
průměr semen. kanálků	13	222.648 79.761	13	206.563 77.724	12	221.253 95.359	9	193.909 104.514
výška semen. epitelu	13	123.397 48.093	13	135.474 53.426	12	123.963 55.223	9	122.220 64.097

Příloha 3: Korelace mezi všemi funkčními vlastnostmi měřenými pro rok 2011



Seznam použitých zkratk: PRE-data naměřená před experimentem, PO-data naměřená po experimentu, VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermie, mid-délka střední části bičíku spermie, tail-délka hlavní části bičíku spermie, total-celková délka spermie, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu, prum.kanal-průměr semenotvorných kanálků, prum.epit-výška epitelu semenotvorných kanálků, sig.1-slabý signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, sig.2-střední signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, sig.3-silný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, sig.rovno-rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, sig.clust-přerušovaný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku („clustery“), akroz.celk-počet spermií se značeným akrozomem.

Příloha 4: Korelační tabulka pro všechny funkční vlastnosti měřené pro rok 2011 po proběhnutí experimentu. Čísla ukazují korelační koeficienty mezi proměnnými (r). Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné ($p \leq 0.05$).

	VAP	VSL	VCL	head	mid	tail	total	abnorm	prum.kanal	prum.epit	sig1	sig.rovno	akroz.celk
VAP	1.000	1.000	0.990	0.350	0.370	-0.410	-0.130	-0.250	0.520	0.040	-0.270	-0.030	-0.020
VSL	1.000	1.000	0.970	0.340	0.330	-0.390	-0.140	-0.230	0.510	0.050	-0.270	-0.040	0.000
VCL	0.990	0.970	1.000	0.360	0.440	-0.460	-0.110	-0.260	0.530	0.030	-0.240	-0.020	-0.060
head	0.350	0.340	0.360	1.000	0.300	-0.200	0.280	-0.170	-0.020	0.170	0.000	-0.220	0.110
mid	0.370	0.330	0.440	0.300	1.000	-0.870	0.020	-0.010	0.380	-0.100	0.000	-0.020	-0.060
tail	-0.410	-0.390	-0.460	-0.200	-0.870	1.000	0.460	-0.260	-0.500	0.070	0.060	0.060	0.020
total	-0.130	-0.140	-0.110	0.280	0.020	0.460	1.000	-0.560	-0.340	-0.010	0.110	0.050	-0.040
abnorm	-0.250	-0.230	-0.260	-0.170	-0.010	-0.260	-0.560	1.000	0.280	0.150	0.180	0.050	-0.180
prum.kanal	0.520	0.510	0.530	-0.020	0.380	-0.500	-0.340	0.280	1.000	0.050	-0.130	-0.010	-0.150
prum.epit	0.040	0.050	0.030	0.170	-0.100	0.070	0.060	0.150	0.050	1.000	0.470	0.150	-0.140
sig1	-0.270	-0.270	-0.240	0.000	0.000	0.060	0.110	0.180	-0.130	0.470	1.000	0.680	-0.650
sig.rovno	-0.030	-0.040	-0.020	-0.220	-0.020	0.060	0.050	0.050	-0.010	0.150	0.680	1.000	-0.800
akroz.celk	-0.020	0.000	-0.060	0.110	-0.060	0.020	-0.040	-0.180	-0.150	-0.140	-0.650	-0.800	1.000

Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermií, mid-délka střední části bičku spermií, tail-délka hlavní části bičku spermií, total-celková délka spermií, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu, prum.kanal-průměr semenotvorných kanálků, prum.epit-výška epitelu semenotvorných kanálků, sig.1-slabý signál acetylovaného α -tubulinu bičku, sig.rovno-rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu bičku, akroz.celk-počet spermií se značeným akrozomem.

Příloha 5: P-hodnoty pro korelační koeficienty pro všechny funkční vlastnosti, které jsou znázorněny v příloze 4.

	VAP	VSL	VCL	head	mid	tail	total	abnorm	prum.kanal	prum.epit	sig1	sig.rovno	akroz.celk
VAP		0.000	0.000	0.107	0.083	0.049	0.542	0.252	0.011	0.862	0.217	0.874	0.912
VSL	0.000		0.000	0.117	0.119	0.068	0.522	0.285	0.013	0.811	0.204	0.860	0.986
VCL	0.000	0.000		0.090	0.038	0.026	0.603	0.223	0.010	0.878	0.261	0.921	0.794
head	0.107	0.117	0.090		0.171	0.349	0.202	0.434	0.941	0.450	0.992	0.311	0.630
mid	0.083	0.119	0.038	0.171		0.000	0.937	0.981	0.072	0.647	0.990	0.942	0.794
tail	0.049	0.068	0.026	0.349	0.000		0.026	0.231	0.016	0.757	0.797	0.791	0.934
total	0.542	0.522	0.603	0.202	0.937	0.026		0.006	0.115	0.977	0.625	0.828	0.851
abnorm	0.252	0.285	0.223	0.434	0.981	0.231	0.006		0.202	0.495	0.408	0.808	0.403
prum.kanal	0.011	0.013	0.010	0.941	0.072	0.016	0.115	0.202		0.823	0.550	0.952	0.481
prum.epit	0.862	0.811	0.878	0.450	0.647	0.757	0.977	0.495	0.823		0.023	0.484	0.529
sig1	0.217	0.204	0.261	0.992	0.990	0.797	0.625	0.408	0.550	0.023		0.000	0.001
sig.rovno	0.874	0.860	0.921	0.311	0.942	0.791	0.828	0.808	0.952	0.484	0.000		0.000
akroz.celk	0.912	0.986	0.794	0.630	0.794	0.934	0.851	0.403	0.481	0.529	0.001	0.000	

Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermie, mid-délka střední části bičíku spermie, tail-délka hlavní části bičíku spermie, total-celková délka spermie, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu, prum.kanal-průměr semenotvorných kanálků, prum.epit-výška epitelu semenotvorných kanálků, sig.1-slabý signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, sig.rovno-rovnoměrný signál acetylovaného α -tubulinu bičíku, akroz.celk-počet spermií se značeným akrozomem.

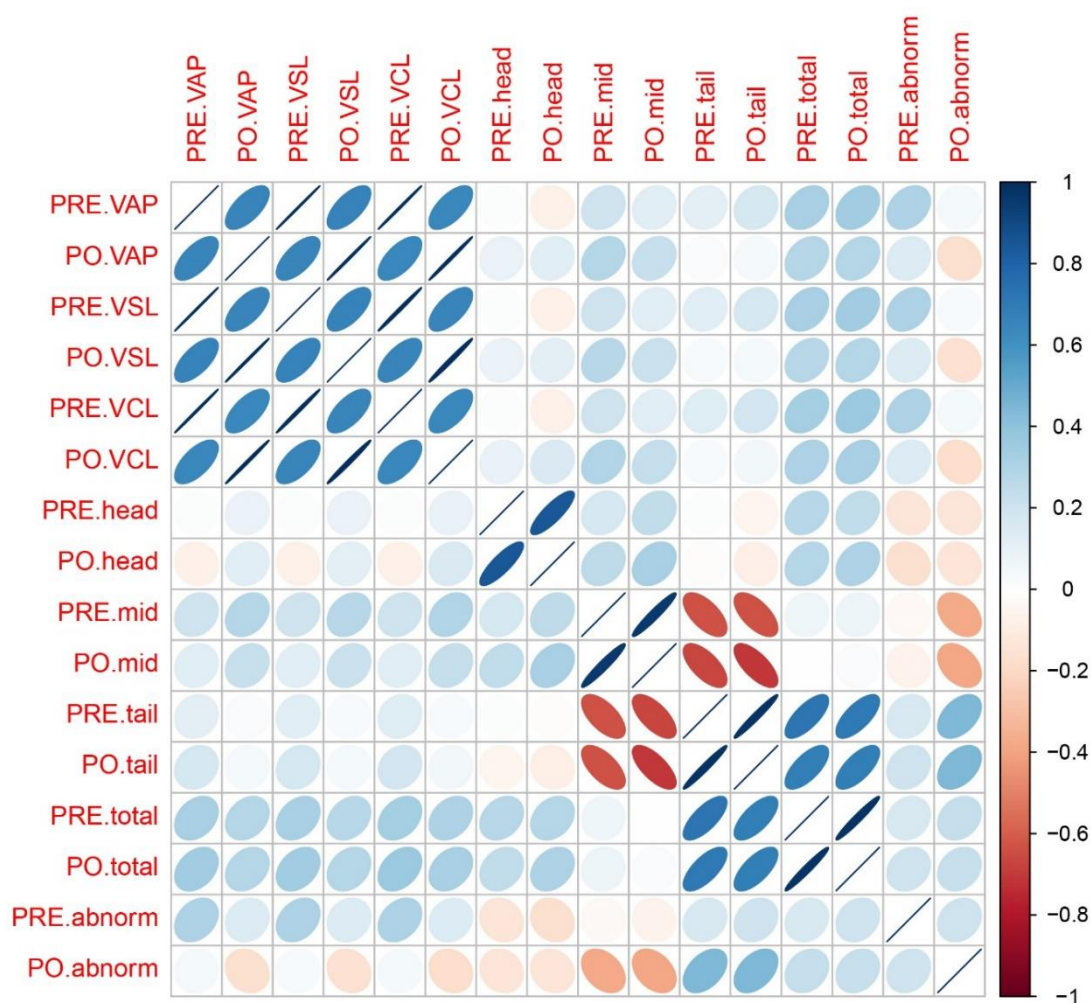
Příloha 6: Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených před experimentem v roce 2012. Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear.

Skupina	Kontrola		Diquat		Lutein		Diquat:Lutein	
Proměnná	Počet (<i>n</i>)	průměr sm. odchylka	Počet (<i>n</i>)	průměr sm. odchylka	Počet (<i>n</i>)	průměr sm. odchylka	Počet (<i>n</i>)	průměr sm. odchylka
VAP	18	65.393 24.186	15	62.186 30.957	17	71.081 29.650	18	65.765 25.968
VSL	18	64.339 23.785	15	60.949 30.170	17	70.096 29.263	18	64.822 25.614
VCL	18	67.118 24.560	15	64.317 32.065	17	72.849 30.202	18	67.492 26.043
délka hlavičky	18	10.798 3.342	15	11.036 4.931	19	10.946 2.492	16	10.808 4.476
délka střední části bičíku	18	31.497 10.120	15	31.002 14.216	19	30.286 8.212	16	28.922 12.798
délka hlavní části bičíku	18	19.072 6.868	15	21.873 11.339	19	23.811 8.718	16	23.812 12.583
celková délka	18	61.367 19.168	15	63.910 28.737	19	65.043 15.482	16	63.542 26.577
podíl abnorm. spermíí	18	0.062 0.049	15	0.046 0.026	18	0.052 0.0264	16	0.059 0.0430

Příloha 7: Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka všech proměnných naměřených po experimentu v roce 2012. Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear.

Skupina	Kontrola		Diquat		Lutein		Diquat:Lutein	
Proměnná	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka	Počet (n)	průměr sm. odchylka
VAP	17	66.553 26.807	14	59.898 30.749	17	64.861 28.657	13	64.073 33.440
VSL	17	65.021 26.404	14	58.385 29.935	17	63.489 27.905	13	62.809 32.790
VCL	17	68.900 27.423	14	62.594 32.033	17	67.002 29.468	13	66.650 34.557
délka hlavičky	18	10.711 3.316	15	11.005 4.917	18	10.815 3.369	16	10.928 4.537
délka střední části bičíku	18	31.575 10.057	15	30.567 14.186	18	29.440 10.692	16	27.465 12.921
délka hlavní části bičíku	18	19.610 6.928	15	22.893 11.960	18	25.143 11.007	16	26.135 14.223
celková délka	18	61.897 19.351	15	64.465 28.997	18	65.399 20.803	16	64.528 26.914
podíl abnorm. spermií	18	0.039 0.0303	14	0.036 0.0254	17	0.042 0.0332	15	0.062 0.0347

Příloha 8: Korelace mezi všemi funkčními vlastnostmi měřenými pro rok 2012



Seznam použitých zkratk: PRE-data naměřená před experimentem, PO-data naměřená po experimentu, VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermie, mid-délka střední části bičíku spermie, tail-délka hlavní části bičíku spermie, total-celková délka spermie, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu.

Příloha 9: Korelační tabulka pro všechny funkční vlastnosti měřené pro rok 2012 po proběhnutí experimentu. Čísla ukazují korelační koeficienty mezi proměnnými (r). Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné ($p \leq 0.05$).

	VAP	VSL	VCL	head	mid	tail	total	abnorm
VAP	1.000	1.000	1.000	0.130	0.220	0.040	0.290	-0.160
VSL	1.000	1.000	0.990	0.120	0.210	0.050	0.280	-0.160
VCL	1.000	0.990	1.000	0.160	0.240	0.050	0.320	-0.170
head	0.130	0.120	0.160	1.000	0.330	-0.080	0.310	-0.140
mid	0.220	0.210	0.240	0.330	1.000	-0.710	0.030	-0.380
tail	0.040	0.050	0.050	-0.080	-0.710	1.000	0.690	0.440
total	0.290	0.280	0.320	0.310	0.030	0.690	1.000	0.230
abnorm	-0.160	-0.160	-0.170	-0.140	-0.380	0.440	0.230	1.000

Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermie, mid-délka střední části bičiku spermie, tail-délka hlavní části bičiku spermie, total-celková délka spermie, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu.

Příloha 10: P-hodnoty pro korelační koeficienty pro všechny funkční vlastnosti, které jsou znázorněny v příloze 9.

	VAP	VSL	VCL	head	mid	tail	total	abnorm
VAP		0.000	0.000	0.344	0.099	0.758	0.033	0.230
VSL	0.000		0.000	0.399	0.124	0.718	0.036	0.249
VCL	0.000	0.000		0.258	0.080	0.693	0.017	0.215
head	0.344	0.399	0.258		0.015	0.559	0.023	0.314
mid	0.099	0.124	0.080	0.015		0.000	0.853	0.004
tail	0.758	0.718	0.693	0.559	0.000		0.000	0.001
total	0.033	0.036	0.017	0.023	0.853	0.000		0.093
abnorm	0.230	0.249	0.215	0.314	0.004	0.001	0.093	

Seznam použitých zkratk: VAP-velocity average path, VSL-velocity straight line, VCL-velocity curvilinear, head-délka hlavičky spermie, mid-délka střed. části bičiku spermie, tail-délka hlavní části bičiku spermie, total-celková délka spermie, abnorm-podíl abnormálních spermií v ejakulátu.